

Campylobacter jejuni -bakteerin esiintyminen lypsykarjatilloilla ja raakamaidossa

Kolme tilaa, kaksi epidemiaa

Maria Nummela
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Elintarvike- ja ympäristötieteiden
laitos
Mikrobiologia
Kevät 2014

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous- ja metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution – Department Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author Maria Nummela			
Työn nimi / Arbetets titel – Title <i>Campylobacter jejuni</i> -bakteerin esiintyminen lypsykarjatilalla – kolme tilaa, kaksi epidemiaa			
Oppiaine /Läroämne – Subject Mikrobiologia			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika/Datum – Month and year August 2014	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 82	
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>Kampylobakteerit aiheuttavat ihmisellä kampylobakterioosiksi kutsuttua suolistotulehdusta, jonka oireet vaihtelevat vatsanväänneistä veriseen ripuliin. Yleisimmin tautia aiheuttava laji on <i>Campylobacter jejuni</i>, jonka infektiivisen annoksen on todettu olevan pieni. Kampylobakteereita elää yleisesti lämminveristen eläinten suolistossa. Ympäristön stressitekijöille herkät kampylobakteerit eivät lisäänty isäntäeläimen ulkopuolella, mutta leviävät ulosteiden mukana ympäristöön. Naudat on tunnistettu tärkeäksi kampylobakteerien varastoksi ja raakamaito on yleisin kampylobakteeriepidemioiden aiheuttaja talousveden ja siipikarjan ohella. Yleisin syy raakamaidon kontaminoitumiseen kampylobakteereilla on ulostesaastutus lypsyn yhteydessä.</p> <p>Tutkimuksessa seurattiin lämpökestoisten kampylobakteerien esiintymistä kolmella lypsykarjatilalla, joista kahdella – tiloilla B ja C – oli ollut raakamaitovälitteinen epidemia vähän ennen seurantajakson alkua. Kolmannella tilalla A kampylobakteereita ei ollut todettu raakamaidosta tai maitosuodattimista ja esiintyminen lypsykarjassa oli vähäistä. Tiloilta kerättiin nautojen ulostenäytteet 1-2 kertaa sekä maito- ja maitosuodatinnäytteet viikottain seurantajakson aikana. Lisäksi tiloilta otettiin ympäristönäytteitä. Näytteet tutkittiin muunnetulla NMKL 119:2007 -viljelymenetelmällä ja kampylobakteerien pitoisuus raakamaidossa määritettiin MPN-menetelmällä. Eristetyt <i>C. jejuni</i> -kannat genotyyppitettiin PFGE-menetelmällä <i>SmaI</i>-entsyymillä. Lisäksi tutkimuksessa selvitettiin raakamaidon hygieniavalvontaan liittyen maitosuodatinten soveltuvuutta kampylobakteereiden tutkimiseen tilatankkimaidosta maitosuodatinten säilyvyyskokeella, jossa maitosuodatinten puolikkaisiin siirrostettiin neljä eri pitoisuutta <i>C. jejuni</i> -bakteeria, mikä jälkeen näytteet kylmälaukuissa huoneenlämmössä säilytetyt näytteet tutkittiin neljänä ajanhetkenä.</p> <p>Kampylobakteereita todettiin naudoista kaikilta kolmelta tilalta, mutta esiintyminen oli huomattavasti alhaisempi kontrollitilalla A kuin epidemiatiloilla B ja C, joilla yli puolet karjasta eritti kampylobakteereita ulosteeseen. Kontrollitilalla A sekä tilalla C ei todettu kampylobakteereita maidosta tai maitosuodattimista seurantajakson aikana. Epidemiatilalla C raakamaidon kampylobakteerikontaminaatio oli todennäköisesti seurausta hetkellisestä huonosta lypsyhygieniasta, sillä suurin osa naudoista eritti ulosteeseen samaa PFGE-tyyppiä, joka eristettiin tilan maidosta epidemianselvityksen yhteydessä. Epidemiatilalla B taas todettiin harvinainen pitkäkestoinen kampylobakteerikontaminaatio, kun maidosta ja maitosuodattimista todettiin kampylobakteereita vielä puoli vuotta epidemian jälkeen. Korkeimmillaan maidon kampylobakteeripitoisuudeksi määritettiin 35 MPN / ml. Maidosta ja maitosuodattimista todettu genotyyppi oli vallitsevana tilan naudoissa. Kontaminaatio ei poistunut viimeiseen näytteenottoon mennessä tilalla tehdyistä puhdistus- ja saneeraustoimenpiteistä huolimatta, eikä sen syytä saatu selvitettyä. Pitkäaikaisen kontaminaation aiheuttajaksi epäiltiin jatkuvaa ulostesaastutusta, maitoputkistossa olevaa biofilmiä tai utaretulehduksesta aiheutunutta kampylobakteerien erittymistä maitoon.</p> <p>Maitosuodatinten säilyvyyskokeessa ympäristön stressitekijöitä suuremmaksi ongelmaksi kampylobakteerien toteamiselle osoittautui tutkimuksessa käytetyn Bolton-rikastusliemen selektiivitekijöille resistentti taustafloora. Myös tilan B näytteenotosta saatujen kokemusten perusteella maito vaikuttaisi maitosuodattimia paremmalta näytematriisilta kampylobakteerien toteamiseen raakamaidosta tutkimuksessa käytetyllä viljelymenetelmällä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Campylobacter jejuni</i> , Lypsykarja, Raakamaito, Epidemia, MPN, Pulsikenttägeelelektroforeesi			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos, Mikrobiologian osaston käsikirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Maisterintutkielman ohjasivat erikoistutkija Marjaana Hakkinen ja professori Per Saris. Tutkimuksen rahoitti Walter Ehrström-säätiö.			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Forestry and Agriculture		Laitos/Institution– Department Department of Food and Environmental Sciences	
Tekijä/Författare – Author Maria Nummela			
Työn nimi / Arbetets titel – Title <i>Campylobacter jejuni</i> in dairy farms – three farms, two outbreaks			
Oppiaine /Läroämne – Subject Microbiology			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's Thesis	Aika/Datum – Month and year August 2014	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 82	
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p><i>Campylobacter</i> cause human campylobacteriosis, a gastroenteritis characterised by symptoms that range from abdominal pain to bloody diarrhea. The most common species behind human infections is <i>Campylobacter jejuni</i>, the infective dose of which has been recognized to be low. Warm-blooded animals are found to be common carriers of <i>Campylobacter</i> in their intestinal tract. As susceptible to environmental stress factors, <i>Campylobacter</i> is unable to multiply outside the host; it spreads to the environment through feces. Cattle has been recognised as an important reservoir of <i>Campylobacter</i> and raw milk the leading cause of <i>Campylobacter</i> outbreaks along with water and poultry. Most commonly, contamination of raw milk derive from fecal contamination during milking.</p> <p>The prevalence of <i>Campylobacter</i> was examined in three dairy farms, of which two, farms B and C, had faced an outbreak carried by raw milk right before the monitoring period of the study commenced. In the third farm A, <i>Campylobacter</i> hadn't been detected either from raw milk or milk filters, and the prevalence in cattle was found to be low. Cattle were sampled 1-2 times and both milk as well as milk filter samples were obtained weekly during the monitoring period. Furthermore, environmental samples were collected. Samples were examined according to the modified NMKL 119:2007 cultivation method and MPN technique was used to quantify <i>Campylobacter</i> in raw milk samples. <i>C. jejuni</i> isolates were genotyped applying PFGE typing with <i>Sma</i>I enzyme. Moreover, concerning the hygienic control of raw milk, suitability of milk filters in detecting <i>Campylobacter</i> from bulk tank milk was examined in a shelf life experiment, in which milk filters were first divided in two parts, then spiked with four different concentrations of <i>C. jejuni</i>. In order to examine how well <i>C. jejuni</i> survives in storage conditions, spiked milk filters were packed into cool bags stored in room temperature for four different time intervals.</p> <p><i>Campylobacter</i> was detected in cattle from all three dairy farms, yet the prevalence in control farm A was substantially lower than in the farms of the outbreak B and C, in which more than half of the cattle shed <i>Campylobacter</i> in feces. In farm A as well as farm C <i>Campylobacter</i> was not detected in milk or milk filters during the monitoring period. In outbreak farm C, the milk was most likely to be contaminated due to poor short-term milking hygiene conditions, as the <i>C. jejuni</i> genotype that most of the cattle shed proved to be identical with <i>C. jejuni</i> strain isolated from bulk tank milk during the investigation of the outbreak. Then again, outbreak farm B faced a rare, long-lasting <i>Campylobacter</i> contamination, as milk and milk filters were still found positive for <i>Campylobacter</i> six months after the outbreak. Up to 35 MPN / ml of <i>Campylobacter</i> was quantified from milk. The genotype detected from the milk and milk filters was dominant in the cattle as well. Nevertheless, the source of the contamination remained unclear and hadn't been eliminated in time for the last sampling in spite of the sanitation and renovation operations made. Continuous fecal contamination, biofilm harboured in the milking machine and direct extraction of <i>Campylobacter</i> to milk due to an udder infection were suspected as potential causes of the long-lasting contamination.</p> <p>In the shelf life experiment of milkfilters the background microflora, which was resistant to the selective supplement of Bolton Broth used in this study, proved a bigger problem for the detection of <i>Campylobacter</i> than its susceptibility to environmental stress. Accordingly, with the protocol used in this study, the experiences gained detecting the samples obtained from farm B suggest that milk is a superior sample matrix over milk filters.</p>			
<p>Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Campylobacter jejuni</i>, Dairy cattle, Raw milk, Outbreak, MPN, Pulsed-field gel electrophoresis</p>			
<p>Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Department of Food and Environmental Sciences, the Library of the Division Microbiology</p>			
<p>Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Master's thesis was supervised by Senior Researcher Marjaana Hakkinen and Professor Per Saris. Research was funded by Walter Ehrström Foundation.</p>			

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet	2
1 Johdanto	7
2 Kirjallisuuskatsaus	9
2.1 Kampylobakteerit	9
2.1.1 Lämpökestoisten kampylobakteerien kasvuvaatimukset.....	9
2.1.2 Sopeutuminen ympäristön stressitekijöihin.....	10
2.2 Kampylobakterioosi	11
2.2.1 Oireet.....	11
2.2.2 Infektiivinen annos.....	12
2.2.3 Virulenssitekijät	12
2.2.4 Immunitetti	13
2.3 Suolistotulehdusta aiheuttavien kampylobakteerien epidemiologia.....	13
2.3.1 Kampylobakterioosin esiintyvyys Suomessa ja EU:ssa	13
2.3.2 Tartunnan lähteet.....	15
2.3.2.1 Kampylobakteeriepidemiat	15
2.3.2.2 Sporadisten tartuntojen riskitekijät.....	17
2.4 Raakamaito	19
2.4.1 Kulutus	19
2.4.2 Raakamaitoa koskeva lainsäädäntö	20
2.4.3 Raakamaidon mikrobiologia	22
2.4.3.1 Maidon koostumus ja antimikrobiset tekijät	22
2.4.3.2 Maidon mikrobifloora	23
2.4.3.3 Hygieniaindikaattorit.....	24
2.4.4 Suomalaisen raakamaidon mikrobiologinen laatu ja siihen vaikuttavat tekijät....	25
2.5 Kampylobakteerit raakamaidossa.....	26
2.5.1 Naudat kampylobakteerien varastona.....	26
2.5.2 Kampylobakteerien esiintyvyys raakamaidossa.....	28
2.5.3 Raakamaitovälitteiset kampylobakteeriepidemiat	29
2.6 Kampylobakteerianalytiikka tartunnan jäljityksessä ja epidemiologiassa.....	30
2.6.1 Raakamaidon kampylobakteerianalytiikka	30
2.6.2 Pulssikenttägeelelektroforeesi genotyyppitysmenetelmänä	31
2.6.3 Muita kampylobakteerien genotyyppitysmenetelmiä.....	32
3 Tutkimuksen tarkoitus.....	34

4 Materiaalit ja menetelmät.....	35
4.1 Tutkimuksessa mukana olleet maitotilat	35
4.2 Näytteenotto	36
4.2.1 Tila A	36
4.2.1 Tila B.....	37
4.2.3 Tila C.....	38
4.3 Lämpökestoisten kampylobakteerien osoittaminen ja tunnistaminen	38
4.4 <i>C. jejuni</i> -kantojen säilyvyyden vertailu raakamaidossa	40
4.5 Säilyvyyskokeet maitosuodattimilla.....	41
4.6 Eristettyjen <i>C. jejuni</i> -kantojen genotyypitys pulssikenttägeelelektroforeesilla.....	42
4.6.1 DNA:n eristys.....	43
4.6.2 DNA:n pilkkominen ja erottelu agarosigeelillä.....	43
4.6.3 Tulosten käsittely Bionumerics-ohjelmalla.....	44
4.7 Tulosten tilastollinen tarkastelu.....	44
5 Tulokset.....	45
5.1 <i>C. jejuni</i> -bakteerin esiintyminen maidossa ja ympäristönäytteissä	45
5.2 <i>C. jejuni</i> -bakteerin esiintyminen ja genotyypijakauma tiloilla	48
5.3 Tilalta B eristettyjen <i>C. jejuni</i> -kantojen säilyvyys raakamaidossa	51
5.4 <i>C. jejuni</i> -bakteerin säilyvyys maitosuodattimissa	53
6 Tulosten tarkastelu	53
6.1 <i>C. jejuni</i> -bakteerin esiintyminen tilojen raakamaidossa.....	53
6.2 Maidon kontaminoituminen ja puhdistustoimenpiteet tilalla B.....	56
6.3 Kampylobakteerien esiintyminen ja genotyypijakauma tiloilla	59
6.4 Maitonäytteiden ja maitosuodatinten vertailu näytematriiseina	61
6.4.1 <i>C. jejuni</i> -bakteerin toteaminen maitosuodattimista	61
6.4.2 <i>C. jejuni</i> -bakteerin säilyvyys raakamaidossa.....	63
6.5 Päätelmät	65
Kiitokset.....	68
Lähteet.....	68

Käytetyt lyhenteet

AFLP	Amplified fragment length polymorphism -analyysi
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Naudan seerumin albumiini (bovine serum albumin)
CSB	Solujen liuotuspuskuri (cell solution buffer)
CDT	Cytotolethal distending toxin
DNA	Deoksiribonukleiinihappo (deoxyribonucleic acid)
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo (ethylenediamine tetraacetic acid)
<i>flaA</i>	Flagelliini A -geeni
HRM	High-Resolution Melting -analyysi
IgG	Immunoglobuliini G
ISO	Kansainvälinen standardointijärjestö (International Organization for Standardization)
LOS	Lipo-oligosakkaridit
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrophotometry -analyysi
NMKL	Pohjoismainen elintarvikkeiden metodiikkakomitea (Nordisk Metodikkommitté för Livsmedel)
mCCDA	Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar
MLST	Multilocus sequence typing -analyysi
MPN	Todennäköinen bakteerimäärä (most probable number)
PCR	Polymeraasiketjureaktio (polymerase chain reaction)
PFGE	Pulssikenttägeelelektroforeesi (pulsed-field gel electrophoresis)
PBS	Fosfaattipuskuroitu saliini (phosphate-buffered saline)
pVir	Virulenssiplasmidi
RFLP	Katkokirjoanalyysi (repetitive fragment length polymorphism)
RpoS	RNA-polymeraasi sigma S -geeni
STEC	Shigatoksiinia tuottava <i>Escherichia coli</i> -bakteeri
SVR	Lyhyt vaihteleva geenialue (short variable region)
TBE	Tris-boraatti-EDTA -puskuri
TE	Tris-EDTA-puskuri
UV	Ultravioletti

1 Johdanto

Lämpökestoiset eli +30–46 °C:een lämpötilassa kasvavat kampylobakteerit aiheuttavat ihmisellä kampylobakterioosiksi kutsuttua suolistotulehdusta, joka on yleisimmin raportoitu elintarvikevälikkeen tartuntatauti Suomessa ja muualla EU:ssa (Hulkko ym., 2010; EFSA, 2013). Vuonna 2013 Suomessa raportoitiin 4068 kampylobakterioositapausta (Tartuntatautirekisteri, 2014). Kampylobakteeri aiheuttaa yleensä itsestään paranevan suolistotulehduksen, jonka oireet vaihtelevat vatsanväänneistä veriseen ripuliin (Black ym., 1988; EFSA, 2005). Yleisimmin suolistotulehdusta aiheuttava laji on *Campylobacter jejuni*, jonka infektiivisen annoksen on todettu olevan pieni: epidemioiden yhteydessä saadun näytön perusteella jopa alle 100 pmy (Robinson, 1981; Teunis ym., 2005; ECDC, 2013; Jaakola ym., 2013).

Lämpökestoiset kampylobakteerit ovat zoonoottisia patogeeneja, joita elää yleisesti lämminveristen eläinten, erityisesti lintujen, suolistossa (Stanley & Jones, 2003). Ne eivät kykene lisääntymään isäntäeläimen ulkopuolella, mutta leviävät ulosteiden mukana ympäristöön ja vesistöihin (Park, 2002; Stanley & Jones, 2003). Suurin osa kampylobakteriooseista on sporadisia yksittäistapauksia tai pieniä perhe-epidemioita, joiden tavallisin tartunnan lähde on siipikarja (EFSA, 2005; Olson ym., 2008). Naudat on kuitenkin tunnistettu tärkeäksi lämpökestoisten kampylobakteerien varastoksi siipikarjan ohella (Nielsen ym., 2000; Hakkinen ym., 2009; Rapp ym., 2012). Vuonna 2003 tehdyssä teurastamokartoituksessa 34 % suomalaisista liha- tai maitokarjatiloihin todettiin kampylobakteeripositivisiksi esiintyvyyden naudoissa ollessa 37 % (Hakkinen ym., 2007). Esiintyvyyden karjassa on kuitenkin todettu vaihtelevan sekä tilojen välillä että vuodenajasta riippuen (Hänninen ym., 1998; Wesley ym., 2000; Hakkinen & Hänninen, 2009; Grove-White ym., 2010).

Raakamaito on siipikarjan ja talousveden ohella yleisin kampylobakteeriepidemioiden aiheuttaja; vuosina 1998–2012 Suomessa raportoitiin viisi raakamaitovälitteistä kampylobakteeriepidemiaa (Hatakka & Halonen, 2000; Schildt ym., 2006; Niskanen ym., 2010a; henkilökohtainen tiedonanto A. Pihlajasaari / M. Hakkinen, 11.2.2014). Koska kampylobakteereita esiintyy yleisesti maitotiloilla, raakamaito saattaa helposti kontaminoitua nautojen ulosteella lypsyt yhteydessä hyvistä hygieniakäytännöistä huolimatta (Nielsen, 2002; Grove-White ym., 2010; Ruusunen ym., 2013). Yleisin syy raakamaidon kontaminoitumiseen kampylobakteereilla on ulostesaastutus, vaikka on

raportoitu myös tapauksia, joissa kampylobakteereita on erittynyt suoraan maitoon utaretulehduksen yhteydessä (Waterman ym., 1984; Hutchinson ym., 1985; Orr ym., 1995; Oliver ym., 2005; Schildt ym., 2006; Luini ym., 2009; Perkiömäki ym., 2012; Bianchini ym., 2014).

Viime vuosina lisääntyneestä lähiruoan ja luomu-tuotteiden suosiosta johtuen kiinnostus raakamaitoa kohtaan on kasvanut (Claeys ym., 2013). Raakamaidon kuluttajat pitävät sitä terveellisempänä ja paremman makuisena kuin pastöroitua ja homogenisoitua maitoa (Jayarao ym., 2006; Perkiömäki ym., 2012). Raakamaidon uskotaan myös aiheuttavan vähemmän vatsavaivoja laktoosi-intolerantikoille, vaikka tieteellistä näyttöä asiasta ei toistaiseksi ole (Claeys ym., 2013). Kuumentamaton raakamaito saattaa kuitenkin sisältää kampylobakteerien lisäksi myös useita muita ihmisen terveydelle vaarallisia bakteereita (Claeys ym., 2013; Ruusunen ym., 2013).

Vuoteen 2014 asti raakamaitoa sai alkutuotantoon liittyen myydä suoraan kuluttajille 2500 kiloa vuodessa, mutta suurempien määrien myynti vaati laitoshyväksynnän (Valtioneuvoston asetus 1258/2011). Maitotilallisten ja vähittäiskaupan raportoiman kasvaneen kysynnän seurauksena Maa- ja metsätalousministeriö säati 1.1.2014 voimaan tulleen raakamaitoasetuksen (MMM 699/2013), jonka tarkoituksena on purkaa myyntirajoituksia, mutta samalla tehostaa suoraan kuluttajille myydyin raakamaidon hygieniavalvontaa.

Raakamaitoasetuksen myötä maidontuottajat ovat velvollisia valvomaan lämpökestoisten kampylobakteerien sekä muutamien muiden ihmiselle tautia aiheuttavien bakteerien esiintymistä raakamaidossa (MMM 699/2013). Koska kampylobakteerien pitoisuuden maidossa on raportoitu olevan yleensä pieni, niitä on usein hankala todeta suoraan raakamaidosta viljelymenetelmin (Humphrey & Becket, 1987; Giacometti ym., 2012a). Lypsylaitteistossa käytetyt maitosuodattimet ovat osoittautuneet useissa tutkimuksissa varteenotettavaksi vaihtoehdoksi patogeenisten bakteerien tutkimiseen raakamaidosta, sillä kaikki tilatankkiin virtaava maito suodattuu niiden läpi (Leone ym., 2010; van Kessel ym., 2011; Giacometti ym., 2012b).

Koska suurin osa maitosuodattimista julkaistuista tutkimuksista koskee kuitenkin muita raakamaidossa esiintyviä patogeeneja tai ne on tehty PCR-menetelmiä hyödyntäen, osana tätä tutkimusta nähtiin tarpeelliseksi selvittää maitosuodatinten soveltuvuutta viljelymenetelmille ja valvonnan tarpeisiin Suomessa. Lisäksi tutkimuksessa seurattiin kampylobakteerien esiintyvyyttä lypsykarjassa ja raakamaidossa kolmella

maitotilalla, joista kahdella oli ollut vuonna 2012 raakamaitovälitteinen kampylobakteeriepideemia.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Kampylobakteerit

Campylobacter -sukuun kuuluu tällä hetkellä ainakin 24 lajia, jotka ovat osa *Campylobacteraceae* -heimoa (LPSN, 2014). Kampylobakteerit ovat gramnegatiivisia sauvabakteereita, joiden solumorfologia vaihtelee käyrästä spiraaliin. Vanhoissa viljelmissä solut voivat esiintyä kokkoideina. Solujen pituus vaihtelee välillä 0,5–5 µm ja leveys 0,2–0,8 µm. Ne eivät muodosta itiöitä. *Campylobacter* -suvun lajeilla on yleensä polaarinen flagella joko toisessa tai molemmissa päissä solua. Niille on ominaista kuperkeikkamainen liikkumistapa. Jotkut lajit ovat kuitenkin liikkumattomia tai niillä voi esiintyä useampia flagelloja. (Debruyne ym., 2008)

Ihmiselle yleisimmin suolistotulehdusta aiheuttavia lajeja ovat *C. jejuni*, *C. coli* ja sekä kehitysmaissa myös *C. upsaliensis*. Useat muutkin *Campylobacter*-lajit on liitetty sairaustapauksiin, mutta niiden merkittävyys taudinaiheuttajina on epäselvä (Humphrey ym., 2007). Tutkielmassa kampylobakteereilla viitataan ihmiselle yleisimmin tautia aiheuttaviin lämpökestoisiin *C. jejuni* ja *C. coli* -bakteereihin.

2.1.1 Lämpökestoisten kampylobakteerien kasvuvaatimukset

Lämpökestoiset kampylobakteerit *C. jejuni* ja *C. coli* kasvavat +30–46 °C lämpötilassa ja niiden optimikasvulämpötila on +42 °C. Mikroaerofiilisina ne kasvavat kaasukehässä, joka sisältää 3–15 % happea ja 3–5 % hiilidioksidia ja kuolevat ilman happipitoisuudessa jopa parissa tunnissa (van Vliet & Ketley, 2001; Humphrey ym., 2007). Kampylobakteerit eivät pysty käyttämään hiilihydraatteja energian- ja hiilenlähteenään ja vaikuttaa myös siltä, että ne ovat riippuvaisia isäntänsä suolistossa valmiiksi pilkotuista aminohapoista (Parkhill ym., 2000; Dasti ym., 2010). Erityisten kasvuvaatimustensa vuoksi ne eivät kykene lisääntymään isäntäeläimen ulkopuolella, kuten elintarvikkeissa tai vedessä (van Vliet & Ketley, 2001). Kampylobakteerit ovat herkkiä UV-säteilylle, kuivumiselle sekä osmoottiselle shokille ja kuolevat alle 3,0 pH:ssa, yli +60 °C:een lämpötilassa (Blaser ym., 1980; Doyle & Roman, 1982; Humphrey ym., 1995; Kemp ym., 2005; Nguyen ym., 2006). Pakastamisen on todettu

vähentävän kampylobakteerien määrää elintarvikkeissa (Studahl & Andersson, 2000; Solow ym., 2003).

2.1.2 Sopeutuminen ympäristön stressitekijöihin

Kampylobakteerit ovat moniin muihin elintarvikevälitteisiin patogeeneihin verrattuna herkkiä ympäristön stressitekijöille. Niiltä puuttuu useita muille gramnegatiivisille lajeille tyypillisiä adaptiivisia responssitekijöitä, kuten globaali säätelytekijä RpoS, joka edistää bakteerin selviämistä stationäärifaasissa (Park, 2002). Lisäksi niiltä puuttuu muille matalammissa lämpötiloissa kasvaville lajeille yleisiä kylmashokki-proteiineja, joiden tiedetään vaikuttavan kasvuun optimilämpötilojen alapuolella (Hazeleger ym., 1998; Phadtare ym., 1999; Park, 2002). Tämä saattaa selittää sen, etteivät ne pysty lisääntymään jääkaappilämpötiloissa (Park, 2002). *C. jejuni* -bakteerien on kuitenkin osoitettu säilyvän elävinä jopa 64 vuorokautta vähäravinteisessa vedessä +4 °C:ssa (Cools ym., 2003).

Herkkyys ympäristön stressitekijöille, erityisesti ilman hapelle, vaikuttaa olevan ristiriidassa lämpökestoisten kampylobakteerien yleisyyteen ruokamyrkytysten aiheuttajana. Onkin arveltu, että niillä saattaa olla muista gramnegatiivisista bakteereista poikkeavia selviytymiskeinoja (Humphrey ym., 2007). Murphyn ym. (2003a & 2003b) tutkimuksissa havaittiin *C. jejuni* -bakteerin erittävän kasvun aikana solunulkoista, happamuuden-, hapen- ja kuumuudenkestävyyttä lisäävää tekijää, joka poikkesi gramnegatiivisille bakteereille tyypillisestä RpoS-mekanismista. Vaikka kampylobakteerit eivät kasva jääkaappilämpötiloissa, niillä on kuitenkin havaittu metabolista aktiivisuutta jopa +4 °C:ssa. Kemotaksis ja aerotaksis toimivat *C. jejuni* -bakteerilla myös matalammissa lämpötiloissa, joten bakteeri kykenee aistimaan ympäristönsä happi- ja substraattipitoisuutta ja hakeutumaan kohti parempia elinolosuhteita (Hazeleger ym., 1998). On myös raportoitu, että jotkut *C. jejuni* -bakteerikannat pystyvät sopeutumaan hapellisiin oloihin. Chynoweth ym. (1998) tutkimuksessa 72,5 % tutkituista, elintarvikkeista ja ihmisistä eristetyistä *C. jejuni* -bakteerikannoista (n = 29) onnistuttiin kasvattamaan aerobisissa oloissa.

Yleinen selviytymiskeino bakteereilla on eläminen kerrostuneissa bakteeriyhteisöissä, biofilmeissä, joita muodostuu kiinteille pinnoille, nesteeseen tai neste-kaasurajapinnoille. Biofilmeissä bakteerit erittävät ympärilleen eksopolysakkarideja, jotka suojaavat niitä ympäristön aiheuttamilta stressitekijöiltä sekä edistävät niiden kiinnit-

tymistä ympäristöön (Simões ym., 2010). Biofilmien sisään muodostuvien mikroilmastojen, joissa on alentunut happitaso, voisi olettaa tarjoavan isäntäeläimen ulkopuolella eläville mikroaerofiilisille kampylobakteereille suotuisimmat elinolot kuin planktoninen kasvutapa (Costerton ym., 1994). Ympäristön stressitekijöiden tiedetään lisäävän planktisten bakteerien kiinnittymistä ympäristöönsä ja aerobisten olojen on raportoitu edistävän biofilmin muodostusta *C. jejuni* -bakteerilla (Nikolaev & Plakunov, 2007; Reuter ym., 2010). Tutkijat ovatkin esittäneet, että biofilmien muodostus voisi selittää ympäristön stressitekijöille herkän *C. jejuni* -bakteerin yleisyyden ruokamyrkytysten aiheuttajana (Joshua ym., 2006; Nereus & Chin-Yi, 2009).

C. jejuni -bakteerin on todettu kolonisoivan muiden bakteerien muodostamia biofilmejä, mutta pitkään luultiin, etteivät ne pysty muodostamaan niitä itse (Buswell ym., 1998; Trachoo ym., 2002). Useissa tutkimuksissa on kuitenkin osoitettu *C. jejuni* -bakteerin kykenevän kiinnittymään erilaisille kiinteille pinnoille ja muodostamaan itsenäisesti kehittyneitä, monitasoisia biofilmejä +37 °C:ssa ja +30 °C:ssa (Joshua ym., 2006; Kalmokoff ym., 2006; Nereus & Chin-Yi, 2009). Joshua ym. (2006) havaitsivat *C. jejuni* -bakteerin muodostavan pintoihin kiinnittyvän biofilmin lisäksi myös neste-kaasu-rajapinnalla kasvavia, kelluvia pellikkelejä sekä pintoihin kiinnittymättömiä bakteerikerääntymiä. *C. jejuni* -bakteerin kyvyn muodostaa biofilmiä on tosin todettu vaihtelevan bakteerikannoittain (Nereus & Chin-Yi, 2009).

2.2 Kampylobakterioosi

2.2.1 Oireet

Kampylobakterioosin oireet vaihtelevat lievästä, vetisestä ripulista ja pahoinvoinnista vakavampaan veriseen ripuliin ja vatsanväännteisiin. Muita yleisiä oireita ovat kuume ja päänsärky. Oireet alkavat yleensä 1–7 ja keskimäärin kolmen vuorokauden kuluttua altistuksesta, ensin kuumeella ja myöhemmin ripulilla (Black ym., 1988; ECDC, 2013). Toisinaan kampylobakterioosi voi ilmetä pelkkänä kuumeena ilman ripulia (Black ym., 1988). *C. jejuni* -bakteeria on eristetty myös oireettomien potilaiden ulosteesta ja sen on todettu voivan aiheuttaa oireettomia infektoita, erityisesti kehitysmaissa (Black ym., 1988; Coker ym., 2002). Yleensä kampylobakterioosi paranee itsestään noin viikon kuluessa, mutta vakavissa tapauksissa sitä voidaan hoitaa myös antibiooteilla (Black ym., 1988; ECDC, 2013).

Kampylobakterioosiin liittyy kohonnut riski sairastua reaktiiviseen artriittiin ja vakavaan ääreishermoston autoimmuunisairauteen, Guillain-Barre -syndroomaan, johon arviolta 1/1000 *C. jejuni* -tartunnoista johtaa (Humphrey ym., 2007; ECDC, 2013).

2.2.2 Infektiivinen annos

C. jejuni -bakteerin infektiivistä annosta on tutkittu vapaaehtoisilla koehenkilöillä ainakin kolmessa tutkimuksessa, ja sen on todettu olevan matala (Robinson, 1981; Black ym. 1988; Tribble ym., 2010). Jo viidensadan solun kerta-annoksen on todettu aiheuttavan vatsanväänteitä ja lievää ripulia sekä käynnistävän kehon vasta-ainetuoton (Robinson, 1981). Epidemioiden yhteydessä ja niistä saatua dataa mallintamalla on kuitenkin saatu viitteitä, että erityisesti riskiryhmiin kuuluvat, kuten lapset, vanhukset ja immuunipuutoksesta kärsivät, voivat saada oireita jo huomattavasti pienemmillä kerta-annoksilla (Riordan ym., 1993; Teunis ym., 2005). Yhdentoista päiväkotilapsen on raportoitu saaneen ripulioireita nautittuaan maitoa, jonka todettiin sisältävän *C. jejuni* -bakteereita alle 10 pmy / 100 ml (Riordan ym., 1993).

Suuremmilla kerta-annoksilla sairastuneiden osuus nousee ja oireet voimistuvat sekä itämisaika vaikuttaa lyhentyvän – erityisesti lapsilla sekä henkilöillä, jotka eivät ole altistuneet kampylobakteereille aiemmin (Teunis ym., 2005; Tribble ym., 2010).

2.2.3 Virulenssitekijät

C. jejuni -bakteerilta ei ole löydetty muille patogeeneille tyypillisiä klassisia virulenssitekijöitä ja sen infektiivisyyteen vaikuttavista tekijöistä tiedetään edelleen vähän (Dasti ym., 2010). Potentiaalisina virulenssitekijöinä pidetään kuitenkin flagellaa, cytolethal distending -toksiineja (CDT), pintarakenteita, kuten kapselia ja lipo-oligosakkarideja (LOS), sekä invaasioon ja adheesioon vaikuttavia proteiineja (Dasti ym., 2010; Habib ym., 2013). Osalla eristetyistä *C. jejuni*-potilaskannoista on pVir-plasmidi, jonka vaikutus invasiivisuuteen ja taudinaiheuttamiskykyyn on kuitenkin epäselvä (Bacon ym., 2000; Habib ym., 2013).

Vapaaehtoisille koehenkilöille tehdyissä altistuskokeissa *C. jejuni* -bakteerin taudinaiheuttamiskyvyn ja oireiden voimakkuuden on havaittu vaihtelevan bakteerikannoittain (Black ym., 1988). Tiettyjen geenien läsnäolon genomissa tai plasmidissa ei kuitenkaan ainakaan toistaiseksi tiedetä yksiselitteisesti vaikuttavan bakteerikantojen

taudinaiheuttamiskykyyn (Havelaar ym., 2009). Eri *C. jejuni* -kannoilla saattaa tosin olla myös erilaisia taudinaiheuttamismekanismeja, mikä selittäisi oireiden vaihtelun potilaiden välillä (Bacon ym., 2000).

2.2.4 Immunitaetti

Epidemioiden yhteydessä, vapaaehtoisilla koehenkilöillä tehdyissä altistuskokeissa sekä tutkittaessa kampylobakteereille työssään altistuvia on havaittu, että ihmiselle saattaa muodostua immunitaetti samalle *C. jejuni* -kannalle, jonka pienille määriille ihminen on aiemmin altistunut tai joka on aiheuttanut sairauden (Jones ym., 1981; Black ym., 1988; Cawthraw ym., 2000; Schildt ym., 2006; Forbes ym., 2009; Tribble ym., 2010). Immunitaetin muodostumiseen vaikuttavat aiemmin sairauden aiheuttaneen bakteerikannan infektiivisyys, bakteeripitoisuus, jolle potilas altistuu sekä sairauden ja uudelleenaltistuksen välillä kulunut aika (Black ym. 1988; Tribble ym. 2010). Tutkimuksissa on havaittu, että potilaille saattaa muodostua kuukauden kestävä immunitaetti kampylobakterioosia vastaan, mikä ei kuitenkaan välttämättä suojaa oireettomalta tartunnalta. (Black ym., 1988; Tribble ym., 2010). Kampylobakteerin pinta-antigeeneille spesifiset IgG-vasta-ainetasot veressä saattavat pysyä koholla jopa vuoden sairastetun kampylobakterioosin jälkeen (Cawthraw ym., 2002).

Sairauden aiheuttanutta *C. jejuni* -kantaan vastaan muodostuneen homologisen immunitaetin on todettu heikkenevän ajan myötä, eikä se suojaa uudelleen infektoitumiselta enää vuoden kuluttua, mutta pienempi osa altistuneista kuitenkin saa oireita ja oireet ovat lievempiä kuin kampylobakterioosiin ensi kertaa sairastuvilla (Tribble ym., 2010). Tutkimuksissa on saatu viitteitä myös mahdollisesta heterologisesta immunitaetista useampia *C. jejuni* -kantoja vastaan, mutta tutkijat eivät ole yksimielisiä sen olemassaolosta (Burr ym., 2005; Forbes ym., 2009; Havelaar ym., 2009).

2.3 Suolistotulehdusta aiheuttavien kampylobakteerien epidemiologia

2.3.1 Kampylobakterioosin esiintyvyys Suomessa ja EU:ssa

Vuosina 2005–2011 kampylobakterioosi on ollut yleisimmin raportoitu zoonoottinen tartuntatauti EU:ssa (EFSA, 2013). Vuonna 2011 raportoituja tapauksia oli 220 209, mutta todellisen määrän arvioidaan olevan yli 9 miljoonaa (EFSA, 2013; Havelaar ym. 2013). Trendi on nouseva; vuodesta 2008 vuoteen 2011 varmistettujen kampy-

lobakterioositapausten määrä EU:ssa kasvoi 15,5 % (EFSA, 2013). Suomessa kampylobakterioosi on vuodesta 1999 lähtien ollut yleisin bakteerin aiheuttama suolistotulehdus ihmisellä (Hulkko ym., 2010). Vuosina 2005–2012 tartuntatautirekisteriin raportoitiin noin 3500–4300 kampylobakteeritapausta vuodessa (Tartuntatautirekisteri, 2014).

Yleisin tautia-aiheuttava *Campylobacter* -laji Suomessa ja muualla EU:ssa on *C. jejuni* ja toiseksi yleisin *C. coli* (ECDC, 2013; Jaakola ym., 2013). Suomessa vuonna 2012 *C. jejuni* tunnistettiin 55 %:ssa kampylobakterioositapauksista ja *C. coli* 4 %:ssa; 41 %:ssa laji jäi määrittelemättä, sillä tyypitystä ei tehty lajitasolle asti. Osa *C. coli* -bakteereiksi tunnistetuista kannoista saattaa tosin olla *C. jejuni* -bakteereita, jotka eivät tuota hippuraasi-entsyymiä (Jaakola ym., 2013).

Suurin osa Suomessa todetuista tartunnoista saadaan ulkomailta. Vuonna 2012 varmistettuja kotimaisia tartuntoja oli 17 % ja ulkomaisia 42 %. Tartuntamaa jäi epäselväksi 41 %:ssa tapauksista (Jaakola ym., 2013). Heinä-elokuussa kotimaisten tartuntojen osuus voi kuitenkin olla jopa 70 % (Nakari ym., 2010).

Suomessa kampylobakteeritartuntojen esiintymistiheys on suurin 20–34 -vuotiailla (> 112/100 000). Yhtenä syynä tähän arvellaan olevan matkailun yleisyys nuorten aikuisten keskuudessa. Alle 5-vuotiailla lapsilla tartuntoja esiintyy enemmän (33/100 000) kuin vanhemmilla, 5–14-vuotiailla lapsilla (21–23/100 000). Kaiken kaikkiaan kampylobakterioosin esiintyvyys 0–14-vuotiailla on kuitenkin Suomessa matala. (Nakari ym., 2010).

Mielenkiintoista on, että kampylobakteerin esiintyvyys vaikuttaa olevan hieman korkeampi miehillä kuin naisilla, suhdeluvun ollessa noin 1,3:1. Ero on nähtävissä sekä lapsilla että aikuisilla (Koehler ym., 2006; Hulkko ym., 2010). Syytä eroon sukupuolten välisessä esiintyvyydessä ei tiedetä.

Kampylobakterioositapausten määrässä on havaittu selkeää vuodenaikaisvaihtelua, joka korostuu etenkin alle 5-vuotiaiden lasten tartunnoissa (Luis ym., 2005). Viimeisten kymmenen vuoden aikana Suomessa on raportoitu eniten tartuntoja heinä-elokuussa. Huippukuukausi on heinäkuu, jolloin määrä on kaksinkertainen verrattuna muiden kuukausien tartuntamääriin (Hulkko ym., 2010; Tartuntatautirekisteri, 2013). Myös muualla EU:ssa varmistetut kampylobakterioositapaukset ovat suurimmaksi osaksi painottuneet lämpimimpiin kuukausiin, kesäkuun puolivälistä syyskuun puoliväliin (EFSA, 2013). Korkeimman esiintyvyyden ajankohta vaihtelee alueittain osuen

esimerkiksi Walesissa jo maaliskuun lopulle ja Ruotsissa vasta elokuun puoliväliin (Nylen ym., 2002).

Lämpötilan, ilmankosteuden sekä päivittäisen auringonpaisteen keston on havaittu vaikuttavan kampylobakterioosin esiintyvyyteen (Luis ym., 2005). Edellä mainitut tekijät vaikuttavat toisaalta myös ihmisten käyttäytymiseen siten, että riski saada kampylobakterioosi esimerkiksi pintavesissä uimassa tai puutteellisesti grillissä kypsennetystä lihasta kasvaa (Studahl & Andersson, 2000; Schönberg-Norio., 2004). Kampylobakteerien esiintyvyys broilereissa on korkeimmillaan kesäkuukausina, millä voi mahdollisesti olla yhteys samoihin aikoihin yleistyviin kampylobakterioositapauksiin ihmisissä (Olson ym., 2008).

2.3.2 Tartunnan lähteet

Suurin osa kampylobakteriooseista on sporadisia eli yksittäistapauksia tai pieniä, perhepiiriin rajoittuvia epidemioita (Olson ym., 2008). Epidemioiden arvioidaan kuitenkin olevan yleisempiä kuin mitä tartuntatautitilastoissa raportoidaan, sillä tartunnat saattavat esiintyä laajalla alueella ja niiden aiheuttajaa on toisinaan vaikea tunnistaa (Gillespie ym., 2003; Schildt ym., 2006; Hansson ym., 2013). Usein epidemia havaitaan, kun yksittäisiä kampylobakterioositapauksia alkaa esiintyä normaalia enemmän tietyllä alueella (Harrington ym., 2002). Lyhytkestoisesta ripulista kärsivät eivät kuitenkaan aina hakeudu lääkäriin. Lisäksi lääkärit välttämättä osaa epäillä kampylobakteeria taudin aiheuttajaksi, jos alueella on esiintynyt toisen patogeenin aiheuttama suolistotulehdusepidemia (Schildt ym., 2006). Lisäksi taudin itämisaika on useita vuorokausia ja näytteiden tutkimiseen kuluu päiviä (Black ym., 1988).

Tavallisin sporadisten kampylobakterioosien tartunnan lähde on siipikarja, kun taas talousvesi ja raakamaito ovat siipikarjan ohella yleisimpiä epidemioiden aiheuttajia teollistuneissa maissa. Hyvin usein tartunnan aiheuttaja jää kuitenkin tuntemattomaksi (EFSA, 2005; Taylor ym., 2013).

2.3.2.1 Kampylobakteeriepidemiat

Suomen laajimmat raportoidut kampylobakteeriepidemiat ovat olleet talousvesivälitteisiä. Vuosina 1998–2012 Suomessa raportoitiin 14 talousvesivälitteistä kampylobakteeriepidemiaa (Hatakka & Halonen, 2000; Hatakka ym., 2001; Hatakka ym., 2002;

Hatakka ym., 2004; Niskanen ym., 2005; Niskanen ym., 2006; Niskanen ym., 2010a; Pihlajasaari ym., 2012; Henkilökohtainen tiedonanto A. Pihlajasaari / M. Hakkinen, 11.2.2014). Talousvesivälitteisten kampylobakteeriepidemioiden aiheuttajaksi on useimmiten paljastunut häiriö kunnallisessa vedenjakelussa tai pienempien epidemioiden kohdalla kaivoveden saastuminen esimerkiksi pintavesivalumien seurauksena (Hatakka ym., 2001; Hatakka ym., 2002; Niskanen ym., 2005; Niskanen ym., 2006). *C. jejuni* oli giardian ja noroviruksen ohella yhtenä tärkeimmistä taudinaiheuttajista Suomen laajimmassa raportoidussa talousvesivälitteisessä epidemiassa vuonna 2007 Nokialla, missä yli 8000 ihmistä sairastui, kun vesijohtoverkkoon pääsi inhimillisen erehdyksen seurauksena 400 000 litraa puhdistettua jätevettä kahden vuorokauden aikana (Niskanen ym., 2010a). Vuonna 2005 Vihdissä kuusisataa ihmistä sai vatsaoireita vesitorniin hukkuneiden oravien saastuttamasta talousvedestä (Niskanen ym., 2006).

Myös elintarvikkeet ovat aiheuttaneet laajoja kampylobakteeriepidemioita, joissa useimmiten välittäjäelintarvikkeena on ollut raakamaito tai siipikarja (EFSA, 2005; Taylor ym., 2013). Vuonna 2005 Skotlannissa 86 ihmistä sai vatsaoireita perinteisissä maalaistanssiaisissa tarjotusta kananmaksapateesta (Forbes ym., 2009). Yhdysvalloissa taas maitotilan myymä raakamaito aiheutti vuonna 2012 laajan, useita osavaltioita koskevan epidemian, jossa sairastui 148 ihmistä (Longenberger ym., 2013). Vuosina 1998–2010 Suomessa raportoitiin 16 kampylobakteerin aiheuttamaa elintarvikevälitteistä epidemiaa, joista suurimmassa sairastui 68 henkilöä (Taulukko 1).

Taulukko 1. Kampylobakteerien aiheuttamat ruokamyrkytysepidemiat Suomessa vuosina 1999–2012*

<i>Vuosi</i>	<i>Sairastuneet / altistuneet</i>	<i>Välittäjäelintarvike</i>	<i>Ruokailupaikka</i>	<i>Lähde</i>
1998	14 / 97	Broilerisalaatti	Oppilaitos	Hatakka & Halonen, 2000
1999	5 / ET	Raakamaito	Koti	Hatakka & Halonen, 2000
1999	15 / ET	Kalkkunaleike	Henkilöstöravintola	Hatakka & Halonen, 2000
2002	5 / 30	Kanasalaatti	Ravintola	Hatakka ym., 2003
2002	6 / 25	Pellolta syödyt mansikat	Useita	Hatakka ym., 2003
2002	6 / 10	Raakamaito	Koti	Schildt ym., 2006
2005	23 / ET	Tuntematon	Tuntematon	Niskanen ym., 2006
2005	14 / ET	Tuntematon	Useita	Niskanen ym., 2006
2006	28 / 421	Siipikarjan lihaa sisältänyt kenttäruoka	Varuskunnan maastoruokailu	Niskanen ym., 2007
2007	7 / 7	Oman kasvimaan salaatti	Koti	Niskanen ym., 2010a
2007	4 / 6	Raakamaito	Koti	Niskanen ym., 2010a
2008	68 / 500	Kalkkuna-kasviskeitto	Henkilöstöravintola	Niskanen ym., 2010b
2008	2 / 2	Ankanrinta	Ravintola	Niskanen ym., 2010b
2010	3 / 4	Kyyhky	Ravintola	Pihlajasaari ym., 2012
2010	5 / 7	Salaatti tai pizza ¹	Koti	Pihlajasaari ym., 2012
2010	5 / ET	Tuntematon	Ravintola	Pihlajasaari ym., 2012
2012	18 / 62	Raakamaito	Koti	Pihlajasaari, 2014 ²
2012	4 / 4	Raakamaito	Koti	Pihlajasaari, 2014 ²
2012	22 / 32	Useita ruokia	Koti	Pihlajasaari, 2014 ²
2012	3 / 4	Ankanrinta	Koti	Pihlajasaari, 2014 ²

¹ Epäilty välittäjä² Toistaiseksi julkaisematon tieto, henkilökohtainen tiedonanto A. Pihlajasaari / M. Hakkinen, 11.2.2014.

ET = Ei tietoa

* Tiedot kerätty paikallislaboratorioiden tekemien ruokamyrkytys-epidemia-ilmoitusten perusteella; todellisenepidemioiden määrä voi olla suurempi.

2.3.2.2 Sporadisten tartuntojen riskitekijät

Sporadisten kampylobakterioosien pääasiallisena tartunnan lähteenä pidetään siipikarjanlihaa, joka selittää noin 20–30 % tartunnoista EU:ssa (EFSA, 2005 ECDC, 2013). Suomessa arviolta 31–34 % kesä-syyskuussa sairastetuista kampylobakteriooseista on arvioitu olevan siipikarjavälitteisiä (Kärenlampi ym., 2003; Hakkinen ym., 2009). Tartunnan voi saada syömällä puutteellisesti kypsennettyä, kontaminoitunutta siipikarjanlihaa tai – mikä vielä yleisempää – ruuan valmistuksen aikana tapahtuneen ristikontaminaation seurauksena (Chen ym., 2001; Kapperud ym., 2003). Siipikarjan

yleisyys tartunnan lähteenä saattaa selittyä sekä broilerinlihan runsaalla kulutuksella että kampylobakteerien korkealla esiintyvyydellä siipikarjassa (EFSA, 2009; Lihatieotus, 2013). Vuonna 2008 EU:ssa tehdyssä teurastamokartoituksessa seitsemässä kymmenestä EU-maissa teurastetusta broilerierästä todettiin umpisuolia tutkimalla *Campylobacter*-suvun lajeja (EFSA, 2009). Samassa tutkimuksessa suomalaisissa broilerin teuraserissä esiintyvyys oli kuitenkin huomattavasti alhaisempi, vain 3,9 %.

Teurastusprosessin yhteydessä lämpökestoisia kampylobakteereita saattaa päätyä siipikarjan suolistosta iholle, ja pesiä sulkiä poistamisen jälkeen auki jääneisiin sulkatuppiin (Humphrey ym., 2007). Niihin on usein jäänyt kosteutta ja happipitoisuus on alhainen, mikä tarjoaa ihanteelliset elinot kampylobakteereille (Habib ym., 2013). Broilerin pintaosien kontaminoituminen teurastusprosessissa on yleistä; EU:n teurastamokartoituksen mukaan kampylobakteerien esiintyvyys broilerinruhojen pinnalla oli EU-maissa keskimäärin 75,8 % (EFSA, 2009). Suomessa kontaminoituneiden broilerinruhojen esiintyvyys oli selvästi alhaisempi, 5,5 %, ja kampylobakteeripitoisuus positiivisissa ruhoissa hyvin pieni, yleensä alle 10 pmy / g (EFSA, 2009). Näin ollen ei ole yllättävää, että Eviran vuonna 2013 tekemässä seurannassa vain 10 %:ssa vähittäismyynnissä myytävästä kotimaisesta raa'asta siipikarjanlihasta todettiin *C. jejuni* (Henkilökohtainen tiedonanto M. Hakkinen, 15.1.2014). Muista EU-maista esimerkiksi Irlannissa ja Espanjassa esiintyvyyden on raportoitu olevan 50 % (Whyte ym., 2004; Domínguez ym., 2002).

Grillattu punainen liha, erityisesti sianliha, on Pohjoismaisissa tapaus-verrokkitutkimuksissa raportoitu kampylobakterioosin riskitekijäksi, vaikka naudan- ja sianlihaa ei pidetä yleisinä tartunnanlähteinä (Studahl & Andersson, 2000; Kapperud ym., 2003; Neimann ym., 2003; EFSA, 2005). Kampylobakteereita esiintyy yleisesti sekä naudoissa että sioissa, mutta teurastuskäytännöistä johtuen ruhot eivät kontaminoidu yhtä helposti kuin broilerin teurastuksessa (Nesbakken ym., 2003; Humphrey ym., 2007; Hakkinen ym., 2009). Lisäksi ruhojen pidennetty ilmajäähdytys vähentää kampylobakteerien määrää merkittävästi, sillä ruhojen pinnalla ne ovat alttiina hapelle ja kuivumiselle (Zhao ym., 2001; Humphrey ym., 2007). Infektoituneiden nautojen ulosteen mukana kampylobakteereita saattaa kuitenkin päätyä raakamaitoon, joka kuumentamattomana nautittuna on tunnistettu myös sporadisten kampylobakterioosien tartunnan lähteeksi (Waterman ym., 1984; Studahl & Andersson, 2000; Neimann ym., 2003).

Muita tapaus-verrokkitutkimuksissa todettuja sporadisten tartuntojen riskitekijöitä ovat puhdistamattoman talousveden, erityisesti kaivoveden, käyttö, pintavesissä uiminen sekä suora eläinkontakti tuotanto- tai lemmikkieläinten kuten koirien ja kissojen kanssa (Kapperud ym., 2003; Neimann ym., 2003; Potter ym., 2003; Schönberg-Norio ym., 2004; EFSA, 2005). Lisäksi matkustelu on osoittautunut merkittäväksi riskitekijäksi, minkä osoittaa myös ulkomaista alkuperää olevien kampylobakteeritartuntojen yleisyys (Neimann ym., 2003; Jaakola ym., 2013). Tapaus-verrokkitutkimuksissa sekä epidemioiden yhteydessä on saatu viitteitä, että kampylobakterioosi saattaa tarttua myös ihmisestä toiseen, mutta tapauksia ei ole pystytty todentamaan (Evans ym., 1996; Kapperud ym., 2003; Hansson ym., 2013).

Maaseudulla asuvilla, etenkin lapsilla, on todettu olevan suurempi riski sairastua kampylobakterioosiin kuin kaupunkialueilla asuvilla. Syynä tähän saattaa olla, että maaseudulla asuvat ovat todennäköisemmin suorassa kontaktissa eläimiin, käyttävät oman kaivonsa vettä talousvetenä ja mahdollisesti juovat raakamaitoa kuumentamattomana (Studahl & Andersson, 2000; Ethelberg ym., 2005; Strachan ym., 2009). Pääasialliset tartunnanlähteet saattavat myös vaihdella maaseutu- ja kaupunkiväestön välillä. Skotlannissa kaupunkilaislasten yleisin kampylobakterioosin tartunnanlähteet oli broilerinliha, kun taas maaseudulla asuvilla tartunnat ovat useammin ympäristöstä ja eläimistä lähtöisin olevia – erityisesti kesäisin (Strachan ym., 2009; Bessel ym., 2012).

2.4 Raakamaito

2.4.1 Kulutus

Tilastollisesti raakamaidon kulutus Suomessa on ollut laskussa viimeisten kymmenen vuoden ajan (Perkiömäki ym., 2012). Vuonna 2012 raakamaidon osuus maidon ja maitotuotteiden kulutuksesta oli noin prosentti (Tike, 2012). Perinteisiä raakamaidon käyttäjiä ovat maitotilalliset perheineen; Yhdysvalloissa vajaa puolet (42,3 %) kyselyyn vastanneista maitotilallisista (n = 248) ilmoitti käyttävänsä tilansa raakamaitoa talousmaitona (Jayarao ym., 2006). Lisäksi pastöroimattomasta raakamaidosta valmistetaan myös juustoja (Mallet ym., 2012).

Samalla, kun maitotilallisten raakamaidon käyttö on vähentynyt, uudenlaisten kuluttajien kiinnostus raakamaitoa kohtaan on viime vuosina herännyt sekä Suomessa että muissa teollisuusmaissa. Uudeksi käyttäjäryhmäksi ovat nousseet eettisesti ja

ekologisesti valveutuneet ihmiset, jotka ovat kiinnostuneita ruokansa alkuperästä ja terveysvaikutuksista (Perkiömäki ym., 2012; Claeys ym., 2013). Yleisimpiä mainittuja syitä käyttää raakamaitoa ovat sen hyvä maku, käsittelemättömyys, luonnollisuus, parempi ravitsemuksellinen koostumus, tavallisen maidon aiheuttamat vatsavaivat ja allergiat, ekologiset syyt sekä lähituotannon tukeminen (Perkiömäki ym., 2012; Claeys ym., 2013; Jayarao ym., 2006). Maitotilalliset käyttävät oman tilansa tankkimaitoa myös sen edullisuuden vuoksi (Jayarao ym., 2006).

Perkiömäki ym. (2012) kartoittivat vuonna 2011 kyselytutkimuksella raakamaitoa suoraan tiloilta ja vähittäismyynnistä ostavien suomalaisten raakamaidon kulutustottumuksia. Suurin osa kyselyyn vastanneista (n = 267 taloutta / kuluttajaa) raakamaidon käyttäjistä oli 24–65-vuotiaita. Joukossa oli kuitenkin myös riskiryhmiin kuuluvia eli pieniä lapsia, vanhuksia, raskaana olevia sekä henkilöitä, joiden vastustuskyky on sairauden vuoksi alentunut. Jopa neljäsosa käyttäjistä oli 1–10-vuotiaita. Vastaajat hankkivat maitoa kerralla melko suuria määriä (1–30 litraa), keskimäärin kuusi litraa. He ilmoittivat säilyttävänsä maitoa kotona jääkaapissa (+6 °C) keskimäärin viisi vuorokautta, mutta pisimmillään säilytysaika saattoi olla jopa kaksi viikkoa. Suurin osa vastaajista nautti raakamaidon sellaisenaan ilman kuumennuskäsittelyä tai kahvin tai teen kanssa.

2.4.2 Raakamaitoa koskeva lainsäädäntö

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY/853/2004) mukaan raakamaidoksi kutsuttua maitoa ei saa kuumentaa yli +40 °C:een lämpötilaan, siitä ei saa poistaa mitään tai siihen ei saa lisätä mitään. Lypsämisen jälkeen raakamaito on jäädytettävä välittömästi +6 °C:seen, jollei tilatankkia tyhjennetä päivittäin (EY/853/2004). Ternimaitoa, jota lehmä tuottaa neljän vuorokauden ajan poikimisesta, lukuun ottamatta raakamaitoa ei saa jäädyttää (MMMa 1368/2011). Maidon on oltava peräisin terveistä eläimistä, eikä se saa sisältää patogeenisia mikrobeja tai toksiineja sairautta aiheuttavia määriä (EY/853/2004). Raakamaidon aistinvaraista laatua ja mikrobilääkejäämiä seurataan säännöllisesti sekä kokonaisbakteerimäärää ja somaattisten solujen määrää kuukausittain (EY 853/2004; MMMa 1368/2011; Valtioneuvoston asetus 1258/2011). Raakamaito on luokiteltu kokonaisbakteerimäärään ja somaattisten solujen määrään perustuvalla laatuhinnoitteluluokituksella kolmeen luokkaan E, I ja II (Taulukko 2).

Taulukko 2. Maidon jakautuminen laatuhinnoitteluluokkiin (Maitohygienialiitto, 2013).

<i>Luokka</i>	<i>Kokonaisbakteerimäärä pmy / ml (2 kk liukuva geometrinen keskiarvo)</i>	<i>Somaattisten solujen määrä / ml (3 kk liukuva geometrinen keskiarvo)</i>
E	< 50 000	< 250 000
I	50 000–100 000	250 000–400 000
II	> 100 000	> 400 000

E-luokan laatuvaatimukset täyttävää raakamaitoa ja ternimaitoa saa alkutuotantoon liittyen myydä suoraan kuluttajalle 2500 litraa vuodessa. Jäädetytettyä ternimaitoa saa lisäksi toimittaa vähittäismyyntiin 2500 litraa vuodessa (Valtioneuvoston asetus 1258/2011). Tätä suurempien määrien myynti edellyttää, että tuottajan on tehtävä ilmoitus elintarvikehuoneistosta sekä tutkittava kerran vuodessa STEC-bakteerit nautojen ulosteista ja määrättyt patogeenit säännöllisesti maidosta (MMMä 699/2013) (Taulukko 3). Maidon osalta suositeltu näytteenottotiheys määräytyy myydyin maitomäärän mukaisesti (Eviran ohje 16040/1, 2014). Lisäksi nautakarjan ulosteista on tutkittava *Salmonella* (MMMä 432/2011).

Taulukko 3. Kuluttajalle luovutettavan raakamaidon turvallisuutta koskevat vaatimukset (MMMä 699/2013).

<i>Mikrobi</i>	<i>Maito</i>	<i>Tutkittava näyttemäärä</i>	<i>Raja-arvo</i>	<i>Vertailumenetelmä</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lehmän ja vuohen	5 x 25 ml	Ei todettu / 25 ml	SFS-EN ISO 11290-1
<i>Salmonella</i>	Vuohen	5 x 25 ml	Ei todettu / 25 ml	SFS-EN ISO 6579
STEC (O26, O103, O111, O145 ja O157)	Lehmän	5 x 25 ml	Ei todettu / 25 ml	CEN ISO/TS 13136
Lämpökestoiset kampylobakteerit	Lehmän	5 x 25 ml	Ei todettu / 25 ml	SFS-EN ISO 10272-1

Jos raakamaidosta todetaan tutkittuja patogeeneja, myynti suoraan kuluttajalle on keskeytettävä ja tuottajan on aloitettava korjaavat toimenpiteet (EY 178/2002; Eviran ohje 16040/1, 2014). Kampylobakteerilöydösten kohdalla vetimien puhdistuskäytäntöjä on tarkastettava, minkä jälkeen otetaan uusi näyte. Raakamaidon myyntiä voidaan

jatkaa, jollei kahdesta viikon välein otetusta maidonäytteestä todeta kampylobakteereita tai muita asetuksessa mainittuja patogeeneja (Eviran ohje 16040/1, 2014).

Raakamaitoasetus velvoittaa elintarvikealan toimijan antamaan raakamaitoa ostavalle kuluttajalle tietoa raakamaidon riskeistä ja sen turvallisesta käsittelystä (MMMä 699/2013). Suoraan tilalta haettu raakamaito tulisi luovuttaa kuluttajalle kahden vuorokauden kuluessa lypsämisestä ja Eviran suosituksen mukaan viimeinen käyttöpäivä on kaksi vuorokautta luovutuksesta (MMMä 699/2013; Eviran ohje 16040/1, 2014). Raakamaidon pakkaaminen ja toimittaminen vähittäismyyntiin vaatii laitoshyväksynnän (MMMä 1369/2011).

2.4.3 Raakamaidon mikrobiologia

2.4.3.1 Maidon koostumus ja antimikrobiset tekijät

Raakamaito on kohtalaisen hyvä kasvualusta monille mikrobeille, sillä se sisältää paljon ravinteita, sen vesiaktiivisuus on korkea ja pH neutraali. Mikrobeille sopivia hiilen ja energianlähteitä ovat maidon sisältämät proteiinit kaseiini ja heraproteiinit sekä rasva, jotka ovat kuitenkin hankalasti hyödynnettävässä muodossa, proteiinit miselleinä ja rasvat globuleina. Vapaita aminohappoja maidossa on vain vähän. Monet mikrobit taas eivät pysty hyödyntämään maidon sokeria laktoosia. (Walstra ym., 2005; Frank, 2007)

Maito sisältää luontaisesti mikrobien kasvua ehkäiseviä eli antimikrobisia tekijöitä, joista tärkeimmät ovat laktoferriini ja laktoperoksidaasisysteemi. Lisäksi maidon lysotsyymilla ja spesifisillä immunoglobuliineilla sekä bakteerien tuottamilla bakteriosideilla on mikrobien kasvua estävä vaikutus (Frank ym., 2007). Laktoferriini on glykoproteiini, jolla on havaittu olevan useita antimikrobisia vaikutusmekanismeja. Se sitoo rautaa ja näin ollen kilpailee siitä bakteerien kanssa, joille se on välttämätön ravinne. Lisäksi laktoferriinillä on bakteriosidista ja bakteriostaattista aktiivisuutta (Farnaud & Evans, 2003). Laktoperoksidaasisysteemissä taas raakamaidon laktoperoksidaasi-entsyymi katalysoi tiiosyanaatin hapettumista maitohappobakteerien tuottamalla vetyperoksidilla (H_2O_2), jolloin muodostuu hypotiosyanaatti-anioneja ($OSCN^-$). Antimikrobinen vaikutus perustuu hypotiosyanaattiin, joka vaurioittaa solukalvoa ja hapettaa proteiineja aiheuttaen entsyymien inaktivoitumista (Naidu, 2000; Frank ym., 2007). Laktoperoksidaasisysteemin vaikutus on joko bakteriosidinen tai bakteriostaattinen riippuen bakteerilajin herkkyydestä ja kasvuvaiheesta. Yleisesti

ottaen gramnegatiiviset bakteerit ovat herkempiä laktoperoksidaasisysteemin vaikutukselle kuin grampositiiviset bakteerit, anaerobit herkempiä kuin aerobit ja stationäärivaiheen solut herkempiä kuin eksponentiaalisen kasvun vaiheessa olevat (Naidu, 2000).

2.4.3.2 Maidon mikrobifloora

Terveillä lehmillä utareen sisällä oleva maito on steriiliä, mutta lypsetessä vedinkanavasta sekä vedinten ja utareiden pinnalta siirtyy maitoon kommensaaleja ihon pinnalla eläviä bakteereita (Joergensen, 1981; Braem ym., 2012; Verdier-Metz ym., 2012). Utaretulehdusta eli mastiittia sairastavan tai yleisinfektiosta kärsivän lehmän maitoon saattaa myös kulkeutua verestä infektion aiheuttaneita patogeeneja (Claeys ym., 2013). Lisäksi maitoon päätyy bakteereita ilmasta, navetta- ja ympäristöstä, lypsylaitteistosta ja ulostekontaminaationa (Vacheyrou ym., 2011). Osa raakamaidossa esiintyvistä bakteereista muodostaa maitoputkistoon biofilmejä, jotka ovat vaikeasti poistettavia ja pitkäkestoisia kontaminaation lähteitä. Maitoputkistojen biofilmien on raportoitu koostuvan pääasiassa grampositiivisista bakteereista sekä sienistä, kun taas gramnegatiiviset bakteerit olivat vähemmistönä (Ksontini ym., 2013).

Raakamaidon mikrobiflooraan kuuluu tavallisesti paljon vedinten pinnalta ja vedinkanavasta peräisin olevia maitohappobakteereita, kuten *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ja *Enterococcus* -sukujen lajeja (Gill ym., 2006; Kuang ym., 2009). Maitohappobakteerit fermentoivat laktoosia tuottaen maitohappoa, joka laskee maidon pH:ta ja näin ollen saattaa muuttaa maidon elinympäristönä epäedulliseksi osalle bakteereista (Walstra ym., 2005).

Vedinkanavasta, ilmasta, navetta- ja ympäristöstä, lypsylaitteista ja ulostekontaminaationa raakamaitoon voi päätyä myös ihmiselle patogeenisiä bakteereita (Gill ym., 2006; Verdier-Metz ym., 2012). Raakamaidosta on eristetty useita ihmispatogeeneja, kuten *Listeria monocytogenes*, *C. jejuni*, STEC (shigatoksiinia tuottava *Escherichia coli*), *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* ja *Bacillus cereus* (Jayarao & Henning, 2001; Jayarao ym., 2006; van Kessel ym., 2011; Ruusunen ym., 2013).

Yleisillä hygienia- ja lypsykäytännöillä on havaittu olevan suuri vaikutus raakamaidon mikrobiflooraan. Korkean hygieniatason tilojen maidossa dominoiva ryhmä ovat maitohappobakteereihin kuulumattomat grampositiiviset bakteerit, kun taas hei-

komman hygieniatason tilojen maidossa esiintyy paljon maitohappobakteereita sekä gramnegatiivisia bakteereita, ja lajidiiversiteetti on suurempi (Verdier-Metz ym., 2009).

2.4.3.3 Hygieniaindikaattorit

Raakamaidon kokonaisbakteerimäärää käytetään yleisen hygieniatason sekä lypsyprosessin hygieenisyyden ja toimivuuden indikaattorina. Vaikka sillä ei pystytäkään erittelemään bakteerien alkuperää ja se kuvastaa vain yleisravintoalustalla aerobisesti kasvavien mikrobien määrää tietyssä ajanhetkenä, se on toimiva väline yleisen hygieniatason arvioimiseen sekä muutosten havaitsemiseen hygieniatasossa (Smigig ym., 2012; Eviran ohje 16040/1, 2014). Enimmäkseen utareen pinnan epiteelisoluista ja valkosoluista koostuvien somaattisten solujen määrää taas käytetään utareterveyden, maidon laadun sekä yleisen hygienian indikaattorina (Sharma ym., 2011). Korkea somaattisten solujen määrä maidossa voi olla merkki bakteeriperäisestä utaretulehduksesta eli mastiitista, jota esiintyy myös oireettomana (Barkema ym., 2006). Lisäksi koliformisten bakteerien ja enterobakteerien määrää maidossa on tutkimuksissa käytetty tuotantotapojen hygieenisyyden arvioinnissa, sillä niiden pääasiallinen lähde on lehmän ympäristö ja suolisto (Salovuori ym., 2005; Meriluoto, 2009).

Koliformisten bakteerien, somaattisten solujen ja kokonaisbakteerien määrän raakamaidossa on raportoitu jossain määrin korreloivan keskenään ja korkean somaattisten solujen määrän myös patogeeneiden esiintyvyyden kanssa (Jayarao ym., 2004; Oliver ym., 2005; Rysanek & Babak, 2005; Pantoja ym., 2009). Sen sijaan kokonaisbakteerimäärällä sekä suolistobakteereihin kuuluvien *E. coli* -bakteerien määrällä ei ole havaittu yhteyttä patogeeneiden esiintymiseen raakamaidossa, vaan patogeeneja on todettu myös korkean hygieniatason tilojen maidosta (Ruusunen ym., 2013).

2.4.4 Suomalaisen raakamaidon mikrobiologinen laatu ja siihen vaikuttavat tekijät

Raakamaidon kokonaisbakteeripitoisuudet ovat Suomessa alhaiset. Vuonna 2012 meijeriin toimitetuista raakamaitoeristä (n = 203 296 kpl) 98,3 prosentissa kokonaisbakteerimäärä oli alle 50 000 pmy / ml eli E-luokan vaatimukset täyttävää. Näistä lähes 80 prosentissa kokonaisbakteerimäärä oli alle 10 000 pmy / ml (Maitohygienialiitto, 2014). Myös enterobakteerimäärä on suomalaisessa raakamaidossa alhainen;

Meriluodon (2009) tutkimuksessa 95 prosentissa näytteistä (n = 282) enterobakteereiden pitoisuus maidossa oli alle 200 pmy / ml.

Suomalaisten maitotilojen määrä on vähentynyt vuodesta 1990 neljännekseen ja samalla tilakoko on kasvanut, minkä seurauksena maidontuotannosta on tullut yhä automatisoidumpaa (Perkiömäki ym., 2012). Sekä tilakoolla että automaattilypsyt käytöllä on raportoitu olevan vaikutusta raakamaidon mikrobiologiseen laatuun. Suurilla tiloilla raakamaidon koliformisten bakteerien, somaattisten solujen ja kokonaisbakteerien määrien on raportoitu olevan korkeammat kuin pienillä ja keskisuurilla tiloilla raakamaidossa (Jayarao ym., 2004; Elmoslemany ym., 2010; Maitohygienialiitto, 2014). Toisaalta suomalaisilla maitotiloilla korkeimmat kokonaisbakteerimäärät vuosina 2005–2012 olivat pienillä, alle 15 lypsävän lehmän tiloilla, joilla todennäköisesti oli käytössä perinteinen putkilypsy (Maitohygienialiitto, 2014).

Suomessa automaattilypsyt käytön on kuitenkin todettu vaikuttavan raakamaidon bakteri- ja solumääriin jopa enemmän kuin tilakoon (Maitohygienialiitto, 2014). Kokonaisbakteerien, somaattisten solujen, psykrotofisten bakteerien ja enterobakteerien määrän tilatankkimaidossa on raportoitu nousseen tiloilla automaattilypsyt siirtymisen jälkeen, mutta suomalaisilla tiloilla nousu ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä (Klungel ym., 2000; Rasmussen ym., 2002; de Koning ym., 2003; Salovuori ym., 2005). Kohonneet määrät voivat viitata ympäristö- ja ulostekontaminaatioon, ja ovat todennäköisesti seurausta automaattilypsylaitteiston riittämättömästä puhdistuksesta (Rasmussen ym., 2002; Salovuori ym., 2005). Meriluodon (2009) tutkimuksessa sekä enterobakteerien esiintyvyys että pitoisuus automaattilypsyllä tuotetussa suomalaisessa raakamaidossa oli korkeampi kuin putkilypsyllä ja lypsyasemalla tuotetussa. Syynä tähän arveltiin olevan automaattilypsyt pois jäävä utareiden ja vedinten puhtauden tarkistaminen ennen lypsintä kiinnittämistä.

2.5 Kampylobakteerit raakamaidossa

2.5.1 Naudat kampylobakteerien varastona

Naudat ovat osoittautuneet tärkeäksi ihmisille patogeenisten kampylobakteerikantojen varastoksi siipikarjan ohella. Raakamaitoon jäljitettyjen kampylobakterioosiepidemioiden lisäksi tämän osoittavat useilla geno- ja fenotyypitysmenetelmillä identtisiiksi todetut ihmisistä ja naudoista eristetyt *C. jejuni* -kannat (Nielsen ym., 2000;

Fitzgerald ym., 2001; Kärenlampi ym., 2007b; Kwan ym., 2008a; Hakkinen ym., 2009; Magnússon ym., 2011; Rapp ym., 2012).

Luonnonvesiä pidetään merkittävänä nautojen kampylobakteeritartuntojen lähteenä, sillä kampylobakteereita esiintyy yleisesti sekä virtaavissa että seisovissa vesissä ja niiden on todettu säilyvän hyvin vesiympäristössä (Rosef ym., 2001; Cools ym., 2003; Hörman ym., 2004; Kemp ym., 2005). On osoitettu, että laidunten liittyminen luonnonvesiin lisää ja vastaavasti klooratun hanaveden käyttö juomavetenä vähentää kampylobakteerien esiintymistä tiloilla (Humphrey & Becket, 1987; Hänninen ym., 1998). Myös kampylobakteerien vähäisempi esiintyminen naudoissa talvella sisäruokintakaudella sekä uusien genotyyppien ilmaantuminen karjaan pääasiassa laidunkaudella viittaavat lehmien pääasiallisen tartuntalähteen olevan laidunympäristössä (Hänninen ym., 1998; Hakkinen & Hänninen, 2009).

Koska kampylobakteerit ovat yleisiä lämminveristen – erityisesti lintujen – suolistossa, ne leviävät helposti ulosteiden mukana pintavesiin ja maaperään (Stanley & Jones, 2003). Luonnonvesien ohella lintuja pidetään potentiaalisina suorina tai välillisinä tartuntalähteinä, sillä linnuista ja naudoista on eristetty yhteneviä *C. jejuni* -genotyyppisiä (Kwan ym., 2008b). Luonnonvaraisten lintujen pääsy samoihin tiloihin rehun kanssa vaikuttaa lisäävän kampylobakteerien esiintyvyyttä tiloilla jonkin verran ($p = 0,17$) (Wesley ym., 2000). Muuttolinnut, kuten hanhet, parveilevat myös usein laidunmailla, jolloin niiden ulosteet saattavat saastuttaa juoma-astioita tai laidunmaihin liittyviä luonnonvesiä (Stanley & Jones, 2003; Kwan ym., 2008b). Lisäksi teurastamoista, siipikarjakasvattamoista, navetoista ja pelloille levitettyjen naudan ja siipikarjan ulosteiden mukana kampylobakteereita saattaa huuhtoutua vesistöihin (Stanley & Jones, 2003).

Eri genotyyppisiä edustavat *C. jejuni* -kannat ovat jossain määrin jakautuneet alueittain ja jotkut tyypit ovat levinneet myös globaalisti (Fitzgerald ym., 2001; Kärenlampi ym., 2007a; Kwan ym., 2008a). On havaittu, että alle kilometrin etäisyydellä toisistaan sijaitsevilla tiloilla genotyyppijakauma on yhtenevämpi kuin kauempana toisistaan olevilla tiloilla (French ym., 2005; Kwan ym. 2008a). Tiloille saattaa päätyä uusia genotyyppisiä esimerkiksi muuttolintujen tai karpästen mukana (Stanley & Jones, 2003; Sproston ym., 2010).

Kampylobakteerien leviäminen eläimestä toiseen myös navetta- ja ympäristössä lienee yleistä, sillä usein kampylobakteeripositiivisilla tiloilla esiintyy vain yhtä tai korkeintaan muutamaa eri genotyyppiä (Nielsen, 2002; Hakkinen ym., 2007). Voi olla, että

sekä kampylobakteerikantojen kolonisointikyvyssä että nautayksilöiden vastustuskyvyssä on eroja, minkä vuoksi tietyt genotyypit vallitsevat tiloilla (Hakkinen & Hänninen, 2009; Rapp ym., 2012). Nautojen erittämien *C. jejuni* -pitoisuuksien on todettu vaihtelevan huomattavasti osan naudoista ollessa niin sanottuja ”supererittäjiä”, jotka erittävät kampylobakteereita ulosteeseen yli 10^5 pmy / g (Rapp ym., 2012). Voisikin pitää todennäköisenä, että supererittäjien kantamat genotyypit myös leviäisivät tilalla muita tehokkaammin. Kampylobakteerit voivat levitä naudasta toiseen navetassa lehmien tai muiden eläinten ulosteella saastuneen veden välityksellä sekä eläinten ja rehun kulkureittien risteämisen vuoksi (Hakkinen & Hänninen, 2009; Perkiömäki ym., 2012; Bianchini ym., 2014). Leviämisen riskitekijöinä pidetään ruokintapöydällä kävelemistä lantaisilla saappailla, eläinten siirtelyä ruokintapöytää pitkin sekä lannan ja rehun käsittelemistä samoilla välineillä, jolloin saastunutta ulostetta saattaa kulkeutua rehun sekaan (Perkiömäki ym., 2012).

Kampylobakteerien esiintyvyys suomalaisilla nautakarjatilastoilla ja naudoissa on verrattain alhainen ja pitoisuudet ulosteessa pieniä. Vuonna 2003 tehdyssä kartoituksessa, joka kattoi 98 % suomalaisissa teurastamoissa teurastetuista naudoista, kampylobakteeripositiivisten tilojen osuus oli 34 % ja esiintyvyys naudoissa 37 % (Hakkinen ym., 2007). Vastaavasti Tanskassa kampylobakteeripositiivisten maitotilojen osuus tutkituista (n = 24) oli 83 % ja esiintyvyys naudoissa 23 % (Nielsen, 2002). Iso-Britanniassa taas *C. jejuni* todettiin kaikilta tutkituilta lypsykarjatilastoilta (n = 15) kaksivuotisessa tutkimuksessa (Grove-White ym., 2010). Suuren tilakoon on raportoitu olevan yhteydessä kampylobakteerien esiintymiseen naudoissa ainakin Suomessa, Isossa-Britanniassa ja Yhdysvalloissa (Wesley ym., 2000; Hakkinen & Hänninen, 2009; Grove-White ym., 2010). Kampylobakteereiden esiintyvyyden naudoissa on myös havaittu olevan hieman korkeampi kesällä ja syksyllä, mikä saattaa olla seurausta laidunkauden aikaisesta jatkuvasta altistuksesta esimerkiksi luonnonvesien kautta (Hänninen ym., 1998; Wesley ym., 2000; Hakkinen ym., 2007; Grove-White ym., 2010). Syyksi on esitetty myös nautojen erilaista ruokavaliota kesäisin laitumella ja talvisin navetassa, mikä voi vaikuttaa naudan suoliston ekosysteemiin kampylobakteereita suosivasti (Grove-White ym., 2010).

Nuorten nautojen suolisto on vanhoja useammin kampylobakteereiden kolonisoima ja pitoisuudet ulosteessa ovat korkeampia (Stanley ym., 1998; Nielsen, 2002; Hakkinen ym., 2007). Vasikoiden suoliston normaalifloora on vielä kehittymätön, mikä altistaa ne tartunnalle yleensä ensimmäisten neljän elinkuukauden aikana (Nielsen, 2002; Stanley

& Jones, 2003). Nuorissa naudoissa yleisimmin esiintyvä laji on *C. jejuni*, kun taas vanhemmissa eläimissä yleisin on *C. hyointestinalis* (Giacoboni, 1993; Hakkinen ym., 2007).

2.5.2 *Kampylobakteerien esiintyvyys raakamaidossa*

Todennäköisin syy raakamaidon saastumiseen kampylobakteereilla on ulostekontaminaatio, joka voi olla seurausta huonosta lypsyhygieniasta tai esimerkiksi viallisesta lypsylaitteiston osasta aiheutuvasta ulosteen pääsystä putkistoon ja tilatankkiin (Waterman ym., 1984; Oliver ym., 2005; Schildt ym., 2006; Perkiömäki ym., 2012). Pienikin määrä, jopa alle 1 g kampylobakteereita erittävän naudan ulostetta voi riittää saastuttamaan tilatankillisen maitoa infektiiviseen pitoisuuteen (Teunis ym., 2005). On tosin raportoitu myös tapauksia, joissa oireettomasta mastiitista kärsivät lehmät erittävät suuria määriä kampylobakteereita suoraan maitoon (Hutchinson ym., 1985; Orr ym., 1995; Luini ym., 2009; Bianchini ym., 2014).

Kampylobakteerien esiintyvyyden raakamaidossa on eri tutkimuksissa raportoitu olevan 0–12 % (Taulukko 4). Raportoidut *C. jejuni* -pitoisuudet ovat pääosin olleet pieniä, alle 1 pmy / ml, mutta raakamaidosta on todettu jopa 100 MPN / 100 ml (Humphrey & Becket, 1987; Heuvelink ym., 2009; Giacometti ym., 2012a).

Taulukko 4. *C. jejuni* -bakteerin esiintyminen tilatankeista kerätyissä raakamaitonäytteissä.

Näytetyyppi	Näytteiden lukumäärä (kpl)	Menetelmä	Positiiviset näytteet (%)	Viittaus
Maito	108	Viljely	0,9	Doyle & Roman, 1982
Maito	131	Viljely	9,2	Jayarao & Henning, 2001
Maito	248	Viljely	2,0	Jayarao ym., 2006
Maito	150	Viljely	4,6	Wysok ym., 2011
Maito	211*	Reaaliaika PCR ja viljely	2,0	Giacometti ym., 2012a
Maito-suodattimet	378	Reaaliaika PCR ja viljely	5,8	Giacometti ym., 2012b
Maito	183	Viljely	0,0	Ruusunen ym., 2013
Maito-suodattimet	196	Viljely	3,0	Serraino ym., 2013
Maito	282	Viljely	12,0	Bianchini ym., 2014

*66 näytettä otettiin tilatankkimaidosta ja loput raakamaidon myyntiautomaateista.

2.5.3 Raakamaitovälitteiset kampylobakteeriepidemiat

Raakamaitovälitteiset kampylobakterioosit esiintyvät yleensä pieninä, maitotilan työntekijöihin ja perhepiiriin rajoittuvina epidemioina (Schildt ym., 2006). Kuumentamattoman raakamaidon tarjoilu joukkoruokailussa, juhlissa tai muissa tilaisuuksissa ruokajuomana on kuitenkin aiheuttanut myös suuria epidemioita (Jones ym., 1981; Kálmán ym., 2000; Peterson, 2003; Heuvelink ym., 2009). Iso-Britanniassa raportoitiin vuonna 1979 kolme viikkoa kestänyt raakamaitovälitteinen epidemia, jossa 2500 koululaista sairastui kampylobakterioosiin juotuaan koulussa tarjottua raakamaitoa (Jones ym., 1981).

Useisiin raakamaitovälitteisiin kampylobakterioosiepidemioihin on liittynyt ryhmävierailu maitotilalla (Evans ym., 1996; Heuvelink ym., 2009; Hauri ym., 2013). Yleensä tartunnan syynä on ollut kuumentamattoman raakamaidon nauttiminen vierailun yhteydessä, mutta tartunta on voitu saada myös likaisten käsien kautta fekaali-oraalireittiä eläinkontaktin seurauksena (Heuvelink ym., 2009).

Yleisimmin raakamaitovälitteisiä epidemioita aiheuttava laji on *C. jejuni* (Evans ym., 1996; Schild ym., 2006; Heuvelink ym., 2009). On kuitenkin raportoitu myös tapaus, jossa *C. hyointestinalis* aiheutti oireettoman tartunnan viidelle maitotilallisen perheenjäsenelle, jotka olivat nauttineet tilan raakamaitoa (Salama ym., 1992).

Usein epidemioiden yhteydessä kampylobakteereita ei saada eristettyä maidosta, mutta välittäjäksi on voitu todeta raakamaito kyselytutkimuksiin perustuvan epidemiologisen näytön ja genotyypiltään potilaskantaa vastaavien, tilalta eristettyjen kantojen perusteella (Jones ym., 1981; Hatakka & Halonen, 2000; Kálmán ym., 2000; Peterson ym., 2003; Heuvelink ym., 2009).

2.6 Kampylobakteerianalytiikka tartunnanjäljityksessä ja epidemiologiassa

2.6.1 Raakamaidon kampylobakteerianalytiikka

Tartunnanjäljityksessä ja epidemiologisessa tutkimuksessa hyödynnetään yleisesti genotyyppitysmenetelmiä, jotka mahdollistavat potilaskannan vertailun epäillyistä välittäjäelintarvikkeista eristettyihin *C. jejuni* -kantoihin ja edelleen elintarvikkeen alkuperän jäljittämisen uusien sairastumisten ehkäisemiseksi. Tärkeimpiä genotyyppitysmenetelmän valintaan vaikuttavia tekijöitä ovat paitsi menetelmän erottelevuus ja herkkyys, myös hinta, helppokäyttöisyys, nopeus ja toistettavuus.

Kampylobakteerianalytiikassa käytetään edelleen yleisesti perinteisiä viljelymenetelmiä, sillä genotyyppitysmenetelmät ja antibioottiresistenssin määrittäminen edellyttävät tutkittavan bakteerikannan eristämistä. Tästä johtuen PCR-pohjaiset menetelmät eivät sovellu yhtä hyvin tartunnan jäljitykseen, vaikka niiden onkin todettu olevan huomattavasti herkempiä, tehokkaampia ja nopeampia kampylobakteerien toteamiseen raakamaidosta (Giacometti ym., 2012b). Viljelymenetelmien ongelmana tosin on, että epäsuotuisissa ympäristöoloissa stressaantuneet *C. jejuni* -bakteerit voivat menettää kykynsä kasvaa laboratorio-oloissa ja siirtyvät tilaan, jossa solu on elossa, mutta ei viljeltävissä (viable but non-culturable state). Viimeaikaiset tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että *C. jejuni* -bakteerin invasiivisuudella ja adhesiivisuudella on positiivinen lineaarinen yhteys viljeltävyyden kanssa. *C. jejuni* -kannat, joita ei ole mahdollista todeta viljelymenetelmin, ovat myös vähemmän infektiivisiä (Verhoeff-Bakkenes ym., 2009). Näin ollen viljelymenetelmin saatujen tulosten voidaan olettaa kuvaavan hyvin infektiivisten *C. jejuni* -bakteerien todellista määrää näytteessä, kun taas PCR-menetelmät tunnistavat näytteestä kaiken kohde-DNA:n riippumatta siitä, ovatko solut elossa, saati infektiivisiä (Habib ym., 2013).

Raakamaitoasetuksen (MMM 699/2013) mukaisesti lämpökestoiset kampylobakteerit on tutkittava raakamaidosta ISO 10272-1 menetelmällä tai vastaavalla validoidulla ja sertifioidulla menetelmällä. Koska kampylobakteerien pitoisuus raakamaidossa on yleensä pieni, niiden eristäminen maitonäytteistä perinteisin viljelymenetelmin on usein hankalaa (Humphrey & Becket, 1987; Giacometti ym., 2012a). Maidon kontaminoitumisen tutkiminen maitosuodattimista on todettu tilatasolla varteenotettavaksi vaihtoehdoksi maitonäytteiden rinnalle niin kampylobakteereilla kuin useilla muillakin raakamaidossa esiintyvillä patogeeneilla (Leone ym., 2010; van Kessel ym., 2011). Paksusta kuitukankaasta valmistetut filtit suodattavat maidosta suuremmat partikkelit ja myös bakteereita konsentroituu niihin (van Kessel ym., 2011; Giacometti ym., 2012b). Perinteisillä lypsymenetelmillä lypsettäessä maitosuodattimet vaihdetaan ennen lypsyn aloittamista (MMM 1368/2011). Automaattilypsytiloilla suodattimet tulisi Maitohygienialiiton suosituksen mukaisesti vaihtaa kolme kertaa vuorokaudessa lypsylaitteiston pesun yhteydessä, mutta virallista säädöstä vaihtotiheydestä ei ole annettu (Esa Manninen, Raakamaidon tuotanto- ja myynti -koulutus, 9.5.2014, Helsinki). Maitosuodattimien tutkimisen on raportoitu olevan merkittävästi herkempi menetelmä patogeeneiden toteamiseen raakamaidosta kuin maidon tutkiminen viljelymenetelmin (Leone ym., 2010; van Kessel ym., 2011; Giacometti ym.,

2012d). Lisäksi suodattimet ovat näytematriisina helppoja käsitellä ja kuljettaa (van Kessel ym., 2011). Ruotsissa lypsusuodattimia hyödynnettiin menestyksekkäästi erään maitotilallisen perhepiirissä puhjenneen raakamaitovälitteisen kampylobakteeriepidemian selvityksessä vuonna 2011 (Hansson ym., 2013). Lupaavista tutkimustuloksista johtuen Suomessa on harkittu maitosuodatinten tutkimista osana raakamaitoasetuksessa (MMM 699/2013) säädettyä raakamaidon hygieniavalvontaa.

2.6.2 Pulssikenttägeelelektroforeesi genotyyppitysmenetelmänä

Pulssikenttägeelelektroforeesi (PFGE) on yleisesti käytetty menetelmä kampylobakteerien genotyyppitykseen kliinisissä ja elintarvikemikrobiologisissa laboratorioissa; Yhdysvalloissa siitä on tullut julkisissa kliinisissä laboratorioissa käytetty standardimenetelmä PulseNet-verkoston myötä (Pittenger ym., 2009). Menetelmässä koko bakteerin genomi pilkotaan harvaan katkovilla restriktioentsyymeillä ja ajetaan agarosigeelissä sykäyksittäin vaihtuvassa sähkökentässä. Sähkökentän suunta vaihtelee, mikä mahdollistaa suurtenkin DNA-palojen (20–200 emäsparia) erottumisen lyhyellä geelillä. Restriktiokohtien ulkopuolinen pilkkoutuminen estetään valamalla bakteerisuspensio agarosigeeliin ennen solujen lyysausta ja pilkkomalla DNA geelissä (Wassenaar & Newell, 2001). *C. jejuni* -bakteerilla yleisimmin käytetyt digestioentsyymit ovat *SmaI* ja *KpnI*, joista ensisijaisesti käytetty on harvemmin katkova *SmaI* (PulseNet). *KpnI*:tä pidetään lähes yhtä erottelevana kuin *SmaI*:tä ja *KpnI*:tä yhdessä, minkä vuoksi sen käyttöä ensisijaisena digestioentsyyminä on esitetty (Michaud ym., 2001; Gilpin ym., 2006). Erottelevin tulos saadaan kuitenkin käyttämällä molempia, jolloin genotyypit voidaan jaotella edelleen alatyypeiksi (Lindmark ym., 2004; Gilpin ym., 2006).

PFGE on käyttökelpoinen, keskihintainen ja erottelukyvyltään hyvä menetelmä, jonka on todettu soveltuvan hyvin geneettisesti monimuotoisena tunnetun *C. jejuni* -bakteerin lyhyen aikavälin epidemiologisiin tutkimuksiin ja tartunnan jäljitykseen (Nielsen ym., 2000; Fitzgerald ym., 2001; Wassenaar & Newell, 2001; Sails ym., 2003; Lindmark ym., 2004; Gilpin ym., 2006). Koko genomin analyysiin perustuvana menetelmänä sen etuna ja haittapuolena on kampylobakteerien genomin rekombinaatiosta johtuva epästabiilisuus, joka on perusta sen hyvälle erottelukyvylle, mutta samalla tekee siitä soveltumattoman populaatiogeneettisiin tutkimuksiin ja laajempiin epidemiologisiin analyysihin (Wassenaar ym., 1998; de Boer ym., 2002). Menetelmä

on hidas, mutta nopeutetulla protokollalla mahdollinen toteuttaa jopa vuorokaudessa (Ribot ym., 2001). PFGE:n suurin kompastuskivi on eri laboratorioden välisen vertailun hankaluus, sillä ajo-olosuhteilla ja jopa tekijällä voi olla vaikutusta profiilien erottumiseen (Fitzgerald ym., 2001). Läheisesti toisiaan muistuttavia PFGE-profiileja voidaan luotettavasti vertailla vain ajamalla ne samalla geelillä. Menetelmä on kuitenkin osoitettu toistettavaksi myös laboratorioden välillä, kun käytetään standardoituja ajo-olosuhteita ja tulkitaan tulokset tietokoneavusteisesti (Ribot ym., 2001). Pieni osa *C. jejuni* -bakteerikannoista on resistenttejä *Sma*I-entsyymille, eivätkä ne näin ollen tyypity sillä (Sails ym., 2003).

2.6.3 Muita kampylobakteerien genotyyppitysmenetelmiä

C. jejuni -bakteerin genotyyppitykseen on kehitetty useita menetelmiä, joista PFGE:n lisäksi riittävän erottelevia ja siksi parhaiten epidemiologisiin tutkimuksiin ja tartunnan jäljitykseen soveltuvia ovat Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ja *flaA*-tyypitys. AFLP-menetelmässä koko genomi pilkotaan kahdella restriktioentsyymillä ja monistetaan palat leimatuilla, katkaisukohtaspesifisillä alukkeilla. Lopulliset reaktiotuotteet erotellaan denaturoivassa agarosigeelissä ja sekvensoidaan automatisoidusti (Wassenaar & Newell, 2001). AFLP on menetelmänä nopea, herkkä ja erottelukyvyltään PFGE:n tasoinen, mutta edellyttää kalliin analyysilaitteiston hankkimista (Kokotovic & On, 1999; Wassenaar & Newell, 2001).

FlaA-tyypitys perustuu geneettisesti vaihtelevan, flagelliiniproteiineja koodaavan *flaA* geenin monistamiseen PCR:lla. Monistustuotteen analysointiin käytettyjä sovelluksia ovat Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ja Short Variable Region (SVR) -sekvensointi sekä uudempi High-Resolution Melting (HRM) -analyysi (Nachamkin ym., 1993; Meinersmann ym., 1997; Merchant-Patel ym., 2010). *FlaA*-tyypitys ei ole yhtä erotteleva kuin PFGE, mutta edullisena ja nopeana sen on osoitettu soveltuvan pienten ja lyhytkestoisten epidemioiden selvittämiseen (Fitzgerald ym., 2001; Wassenaar & Newell, 2001; Sails ym., 2003). Sekä *C. jejuni* -bakteerin koko genomista että *fla*-lokuksen epästabiilisuudesta johtuen kumpikaan menetelmistä ei kuitenkaan sovellu laajoihin epidemiologisiin tutkimuksiin (de Boer ym., 2002; Sails ym., 2003; Hiatt ym., 2007).

Multilocus Sequence Typing (MLST) taas on soveltuvampi menetelmä evolutiivisiin ja populaatiogeneettisiin tutkimuksiin kuin epidemiologiaan, vaikka sen hyö-

dyntämistä myös tartunnan jäljityksessä on kokeiltu (Sails ym., 2003). Menetelmä perustuu seitsemän, verrattain konservoituneen, solun välttämättömistä metabolisista toiminnoista huolehtivan (house-keeping) geenin monistamiseen ja sekvensointiin. Alleeliprofiilit jaotellaan eristettyjen bakteerikantojen sukulaisuussuhteiden perusteella sekvenssityypeiksi (Sequence Type), jotka voidaan edelleen jaotella sukulaisuussuhteiden perusteella klooniryhmittymiksi (Clonal Complex). MLST mahdollistaa laboratorioden välisen vertailun ja datan jakamiseen on perustettu globaali tietokanta (Dingle ym., 2001; Pittenger ym., 2009). Menetelmä on nykyisin yleisesti käytetty kampylobakteerien evolutiivisissa tutkimuksissa, mutta sekvensointiin perustuvana menetelmänä se on kuitenkin kallis, aikaa vievä ja monivaiheinen (On, 2013).

Uusia lupaavia, rutiinianalytiikkaan ja epidemianselvitykseen soveltuvia menetelmiä ovat Binary typing -sovellukset, jotka perustuvat tiettyjen, ihmisille patogeenisissa *C. jejuni* -bakteerikannoissa tunnistettujen geenien esiintymiseen genomissa (Cornelius ym., 2010; On, 2013).

3 Tutkimuksen tarkoitus

- I Seurata *C. jejuni* -bakteerin esiintymistä tilojen B ja C raakamaidossa epidemioiden jälkeen.
- II Selvittää raakamaidon kontaminoitumisen syytä sekä seurata puhdistustoimenpiteiden vaikutusta tilalla B.
- III Vertailla *C. jejuni* -bakteerin esiintymistä lypsykarjassa ja eristettyjen bakteerikantojen genotyyppijakaumaa kahdella maitotilalla, joilla oli ollut raakamaitovälitteinen kampylobakteeriepidemia sekä tilalla, jolla kampylobakteereita ei ollut todettu maidosta.
- IV Vertailla maitosuodattimia ja maitoa näytematriiseina sekä arvioida kampylobakteerien säilyvyyttä niissä.

4 Materiaalit ja menetelmät

Tutkimusaineisto kerättiin kolmelta maitotilalta, joista kahdella – tiloilla B ja C – oli vähän ennen tutkimusjakson alkamista ollut raakamaitovälitteinen, *C. jejuni* -bakteerin aiheuttama epidemia. Tiloilla käytettiin oman tilan raakamaitoa talousmaitona ja lisäksi tilalla B maitoa myytiin suoraan kuluttajille itsepalveluperiaatteella. Tila A toimi tutkimuksessa kontrollitilana, jolla kampylobakteereita ei ollut todettu maidosta ja niiden esiintyminen lypsykarjassa oli vähäistä.

4.1 Tutkimuksessa mukana olleet maitotilat

Etelä-Suomessa sijaitsevalla tilalla A oli 46 lehmäpaikan maakuuparsipihatto. Tilalla oli käytössä automaattilypsy (Lely Astronaut).

Länsi-Suomessa sijaitsevalla tilalla B oli noin 40 lypsävää lehmää, jotka lypsettiin putkilypsillä. Nelilapsinen perhe oli saanut ruokamyrkytysoireita juotuaan tilalta B haettua raakamaitoa kuumentamattomana. Isä ja kaksi lasta olivat myös sairaalahoidossa. Kaikkien lasten ulosteesta eristettiin *C. jejuni*. Toisessa samalla viikolla ilmenneessä tapauksessa kaksi teini-ikäistä poikaa sairastui kampylobakterioosiin ja molempien ulosteesta eristettiin *C. jejuni*. Pojat olivat nauttineet 4–5 vuorokautta aiemmin pidetyissä juhlissa tilan B raakamaitoa kuumentamattomana. Lisäksi tilan B perheenjäsenillä isää lukuun ottamatta oli ilmennyt vatsatautia, joka ei kuitenkaan vaatinut sairaalahoitoa ja jonka aiheuttajaa ei selvitetty. Epidemianselvityksen yhteydessä kuudelle raakamaitoa tilalta B noutaneelle perheelle (n = 54) sekä juhliin osallistuneille (n = 10) oli lähetetty kysely, johon vastasi 62 henkilöä (97 %). Tulosten perusteella 18 henkilöllä (29 %) vastanneista oli ilmennyt vatsavaivoja ja ripulia. Ulostenäytteet tutkittiin 14 henkilöltä, joilla oli esiintynyt ripulia, ja näistä yhdellätoista (79 %) todettiin *C. jejuni*. Neljä ripulioireita saanutta eivät kuitenkaan olleet juoneet kuumentamatonta raakamaitoa. Yksitoista ripulioireita saanutta taas ilmoitti olleensa suorassa eläinkontaktissa. (Epidemiaselvitysraportti A, 2013; Kunnaneläinlääkärin suulliset tiedonannot, 1.12.2012–31.3.2013).

Epidemianselvityksen yhteydessä kunnaneläinlääkäri otti tilalta B näytteet raakamaidosta, maitosuodattimista ja nautojen ulosteista sekä pintasivelynäytteet lattia-kaivosta ja pesuveden poistoputkesta. Näytteistä todettiin *C. jejuni* paikallisessa elintarvike- ja ympäristölaboratoriossa, ja eristetyt bakteerikannat genotyyпитettiin puls-

sikenttägeelielektroforeesilla Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran mikrobiologian tutkimusyksikössä Helsingissä. Lisäksi maidosta todettiin *S. aureus* (40 pmy / ml), jolla ei kuitenkaan todettu toksiinimuodostusta (Epidemiaselvitysraportti A, 2013).

Tartunnan aiheuttajaksi todettiin raakamaito yhtenevien potilaskantojen ja tilalta eristettyjen kantojen perusteella, vaikka epidemiologinen näyttö ei selittänytkaan sairastumisia niiden henkilöiden osalta, jotka eivät olleet nauttineet kuumentamatonta raakamaitoa (Epidemiaselvitysraportti A, 2013).

Seurantajakson aikana ja sen jälkeen 24.4.2013 asti maitotilalla B tehtiin puhdistus- ja saneeraustoimenpiteitä kampylobakteerikontaminaation poistamiseksi. Tilan maitoputkistoa sekä -tankkia huuhdottiin happamalla desinfektioaineella, jonka valmiin käyttöliuoksen pH on valmistajan mukaan 1 (F 264 Maisan, KiiltoClean, Suomi). Ruokintapöytää ja pilttuita desinfioitiin kuivadesinfektioaineella (Stalosan®F, valmistaja ei tiedossa). Lisäksi juoma-astioita desinfioitiin desinfektioliuoksella (1–3 %) (Virkon, valmistaja ei tiedossa). Tilalla myös uusittiin lypsylaitteiston maitoletku ja tiivisteet sekä vaihdettiin komponentteja, joilla edesautettiin laitteiston puhdistusta.

Tilalla C, joka sijaitsi myös Länsi-Suomessa, oli 80 lypsävää lehmää ja käytössä sekä lypsyasema että automaattilypsy. Neljä tilan työntekijää sairastui kampylobakterioosiin marraskuussa 2012. Sairastuneista ainakin kaksi oli juonut tilan raakamaitoa kuumentamattomana. Alkuvuodesta 2013 tilatankista otetusta maitonäytteestä sekä lypsyaseman ja automaattilypsyn kahdesta maitosuodattimesta eristettiin paikallisessa elintarvike- ja ympäristölaboratoriossa *C. jejuni*. Myös sairastuneiden ulosteesta eristettiin *C. jejuni*. Potilaskantoja ei genotyyppitetty, mutta raakamaito todettiin tartunnanaiheuttajaksi epidemiologisen näytön perusteella. Maidosta ja maitosuodattimista eristetyt *C. jejuni* -kannat genotyyppitettiin pulssikenttägeelielektroforeesilla Evirassa. (Epidemiaselvitysraportti B, 2013; henkilökohtainen tiedonanto tilan C omistajalta, 18.3.2013)

4.2 Näytteenotto

4.2.1 Tila A

Maitotilalta A kerättiin näytteitä yhdentoista viikon ajan (4.12.12–21.2.13), kerran tai kaksi kertaa viikossa. Litran maitonäytteet laskettiin maitotankin hanasta steriileihin yhden litran lasipulloihin (Schott, USA). Automaattilypsylaitteistossa käytetyt maito-

suodattimet kerättiin jokaista maitonäytteenottoa edeltävältä päivältä. Suodattimet pakattiin yksittäin yhden litran Minigrip-pusseihin, kostutettiin viidellä millilitralla 0,1 % peptonisuolaliuosta (VWR, USA) ja säilytettiin kylmiössä. Laboratoriossa maitosuodattimet puolitettiin ja toinen puoli pakastettiin (−80 °C) steriilissä verkko-pussissa (BagPage®, Ranska) myöhempää käyttöä varten.

Pihaton viidestä juomakaukalosta otettiin lisäksi pintasivelynäytteet kerran viikossa. Niistä yksi oli suurempikokoinen juoma-automaatti ja neljä muuta pienempiä juomakulhoja. Näytteet otettiin pyyhkäisemällä steriilillä näytteenottosienellä (5 cm x 10 cm) (Polywipe, Medical Wire, Englanti) juomakulhon pintaa heti vesipinnan yläpuolelta, minkä jälkeen sienet pakattiin yksittäin Minigrip-pusseihin.

Joulukuussa ja tammikuussa tutkitut ulostenäytteet kerättiin pihatosta mahdollisimman tuoreista ulosteista steriileihin muovipusseihin. Näytteet käytiin noutamassa maitotilalta ja tutkittiin välittömästi Eviran mikrobiologian tutkimusyksikössä Helsingissä.

4.2.1 Tila B

Seurantajakson (11.12.12–11.3.13) aikana kunnaneläinlääkäri otti maitotilalta raakamaito- ja maitosuodatinnäytteet kerran viikossa kolmen kuukauden ajan. Litran maitonäytteet otettiin kahteen 500 ml steriiliin lasipulloon (Schott, USA). Maitosuodatinnäytteet kerättiin yhden litran Minigrip -pusseihin samaan tapaan kuin tilalla A. Nautojen ulostenäytteet otettiin kahden litran Minigrip -pusseihin kaksi kertaa seurantajakson aikana. Lisäksi pintasivelynäytteitä otettiin steriileillä sienillä maitoputken hanasta kerran ja juoma-astioista sekä nännikumien sisäpinnoilta kahdesti seurantajakson aikana. Lypsämisen yhteydessä vedinten pyyhintään käytetty lypsyliina tutkittiin myös kahdesti. Lisäksi tutkittiin useita pintasivelynäytteitä ruokintapöydiltä, rehuvaunusta, vasikoiden vesinipoista, pesuveden poistoputkesta sekä tankkihuoneen lattiakaivosta. Seurantajakson jälkeen toukokuussa ja kesäkuussa otettiin kaksi vesinäytettä (8 litraa ja 12 litraa) steriileihin kahden litran lasipulloihin (Schott, USA) pestyn maitoputkiston läpi juoksutetusta talousvedestä. Näytteet lähetettiin kylmälaukkuihin pakattuina postitse tutkittaviksi Eviran mikrobiologian tutkimusyksikköön Helsinkiin. Näytteet saapuivat 24–72 tunnin kuluessa näytteenotosta ja tutkittiin välittömästi.

4.2.3 Tila C

Seurantajakson (28.1.13–5.3.13) aikana tilalta otettiin kerran nautojen ulostenäytteet ja pintasivelynäytteet juoma-astioista sekä viisi kertaa litran raakamaitonäyte ja maitosuodatinnäytteet lypsyautomaatista sekä lypsyasemasta. Näytteet otettiin samoin kuin tilalla A ja B, ja ne lähetettiin kylmälaukuissa tutkittavaksi Eviran mikrobiologian tutkimusyksikköön Helsinkiin. Näytteet saapuivat 24 tunnin kuluessa näytteenotosta ja tutkittiin välittömästi.

4.3 Lämpökestoisten kampylobakteerien osoittaminen ja tunnistaminen

Lämpökestoiset kampylobakteerit osoitettiin ja tunnistettiin ympäristö- ja ulostenäytteistä NMKL 119:2007 -menetelmällä. Ulostenäytteitä punnittiin 10 g steriiliin verkkopussiin spaattelin avulla ja lisättiin 90 ml Bolton-rikastuslientä (Campylobacter Enrichment Broth, LAB 135; Selective Supplement X131 [LAB M, Iso-Britannia]). Pintanäytteenottosienet, maitosuodattimet (~ 30 g [putkilypsy ja lypsyasema] ja ~ 60 g [automaattilypsy]) sekä tilan B lypsyliinat (25 cm x 25 cm) rikastettiin verkkopusseissa 225 ml:ssa Bolton-rikastuslientä. Maitonäytteet tutkittiin kvantitatiivisesti MPN (most probable number) -menetelmällä viidellä rinnakkaisella ja kolmella peräkkäisellä laimennoksella (Taulukko 5). Seurantajakson jälkeen otetuista maitonäytteistä tutkittiin 5 × 25 ml 225 ml:ssa Bolton-rikastuslientä.

Taulukko 5. Maidon laimennustasot MPN-menetelmässä

Taso	Laimennos (ml maitoa / ml Bolton-rikastuslientä)
1	25 ml / 225 ml
2	5 ml / 45 ml
3	1 ml / 9 ml
4	1 ml laimennosta 10^{-1} / 9 ml
5	1 ml laimennosta 10^{-2} / 9 ml

Tilalta B otetut vesinäytteet suodatettiin (Sartorius GmbH, Saksa) nitroselluloosa-suodattimien (ϕ 0,45 μ m) läpi (Merck Millipore, Saksa). Suodatin vaihdettiin aina, kun se tukkeutui. Kaikki suodattimet rikastettiin samassa 500 ml lasipullossa 225 ml:ssa esilämmitettyä (+37 °C) Bolton-rikastuslientä.

Rikastuspussit suljettiin taittamalla pussien suut kaksin kerroin ja lasipulloissa oli korkkien sijaan steriilit foliot, jotta kaasut pääsivät vaihtumaan inkuboinnin aikana. Näytteet inkuboitiin mikroaerobisesti (+41,5 °C / 20–24 h; 5 % O₂, 10 % CO₂ [ThermoForma, Thermo Electron Corporation, USA]). Vesinäytteet inkuboitiin +37 °C / 24–48 h samoissa kaasuoloosuhteissa.

Rikastusviljelmistä siirrostettiin 20–24 tunnin inkuboinnin jälkeen 10 μ l silmukallinen hajotusviljelynä modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar -maljoille (mCCDA) (Oxoid Ltd., Iso-Britannia) ja inkuboitiin mikroaerofiilikasvatuskaapissa (+41,5 °C / 48–72 h; 5 % O₂, 10 % CO₂) tai kaasunkehityspusseilla (CampyGen, Oxoid Ltd., Iso-Britannia) varustetuissa anaerobiastiossa (+41,5 °C / 48–72). Vesinäytteet viljeltiin uudelleen 48 tunnin inkuboinnin jälkeen. Kontrollikannat *C. jejuni* (ATCC 33560) ja *C. coli* (ATCC 33559) viljeltiin rinnan näytteiden kanssa. Tyypilliset kampylobakteeripesäkkeet olivat mCCDA-maljalla vaaleanharmaita, litteitä ja bakteerin liikkuvuudesta johtuen toisinaan levinneitä.

Varmistustestejä varten mCCDA-maljoilta viljeltiin vähintään viisi tyypillistä pesäkettä naudanveriagarmaljoille (Oxoid Ltd., Iso-Britannia [sitraattiveri, bioTRADING, Alankomaat]) (+37 °C tai +41,5 °C / 20–72 h, 5 % O₂, 10 % CO₂). *Campylobacter* -solujen tyypillinen, kuperkeikkamainen liikkuvuus varmistettiin mikroskopoimalla liikkuvuuspreparaatit 100 x suurennuksella vaihesiirtomikroskoopilla (Nikon Eclipse E200100x). Solumorfologialtaan tyypilliseksi tunnistettiin pienet, käyrät tai spiraalin muotoiset solut; vanhoissa viljelmissä myös kokkoidit. Niille tehtiin lisäksi katalaasi- ja oksidaasikokeet (Oxoid Ltd., Iso-Britannia) ja aerobinen kasvu naudanveriagarmaljalla tarkistettiin (+37 °C / > 18 h). Lämpökestoiset kampylobakteerit ovat katalaasi- ja oksidaasi-positiivisia, eivätkä kasva aerobisesti.

Eristetyt bakteerikannat tunnistettiin *C. jejuni*-bakteereiksi hippuraasi-entsyymin tuoton (Sigma-Aldrich, USA) sekä nalidiksiinihappoherkkyyden (Oxoid Ltd., Iso-Britannia) perusteella ISO 10272–1:2006 -menetelmän mukaisesti. Eristetyt *Campylobacter* -kannat pakastettiin –70 °C Brucella-liemeen, jossa oli 15 % glyserolia (BBL, Becton Dickinson, USA). Hippuraattinegatiiviset ja nalidiksiinihapolle resistentit *Campylobacter* -kannat tunnistettiin massaspektrofotometriaan perustuvalla MALDI-

TOF -laitteella (Microflex, Bruker Corp., Saksa; Ohjelmat: flexControl Version 3.4 [Build 119]; MALDI Biotyper Version 3.1 [Build 65], Bruker Daltonik GmbH).

Lajitason tunnistus katsottiin luotettavaksi tunnusluvun ollessa > 2,3.

Maitonäytteiden MPN-arvot laskettiin MPN Build 23 -ohjelmalla (Mike Curiale, <http://i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>) ja pitoisuudet ilmoitettiin MPN/ml.

4.4 *C. jejuni* -kantojen säilyvyyden vertailu raakamaidossa

Tilan B epidemiakannan suhteellista kestävyyttä ympäristön stressitekijöitä vastaan tutkittiin raakamaidolla tehdyssä säilyvyyskokeessa, jossa vertailtiin viiden, tilalta B eristetyn, eri *SmaI*-tyyppejä edustaneen *C. jejuni* -bakteerikannan säilyvyyttä tuoreessa raakamaidossa. Tutkimuksessa käytetyt kannat HMIK-12121, HMIK-12122, HMIK-12127 ja HMIK-12135 oli eristetty ulostenäytteistä ja HMIK-909 raakamaidosta. Siirrostettavia kantoja kasvatettiin mikroaerobisesti koeputkissa (+37 °C / 24 h; 5 % O₂, 10 % CO₂) 10 ml:ssa Brucella-rikastuslientä (BBL, Becton Dickinson, USA), minkä jälkeen niistä viljeltiin puskuroituun peptonisuolaliuokseen (Dilucup & Dilushaker III, Lab Robot, Ruotsi) tehdyt laimennussarjat naudanveriagarille (+41,5 °C / 24 h) ja siirrettiin kylmiöön (+6 °C) kaasunkehityspusseilla varustetuissa anaerobiastioissa. Siirrostusta varten kasvatetuista viljelmistä tehtiin uudet laimennussarjat, jotka viljeltiin naudanveriagarille siirroksen todellisen pitoisuuden varmistamiseksi. Tuore, samana päivänä tilalta noudettu raakamaito mitattiin steriileihin kahden litran pulloihin 1,5 litran annoksina, jotka siirrostettiin sopivilla laimennoksilla siten, että tavoiteltu maidon *C. jejuni* -pitoisuus oli 35 pmy / ml.

Kahtena rinnakkaisena valmistetut näytteet säilytettiin kylmiössä (+6 °C) hapel-
lisissa oloissa. Maitonäytteet tutkittiin neljässä aikapisteessä (24 h, 48 h, 72 h ja 96 h) rikastamalla 5 × 25 ml 225 ml:ssa Bolton-rikastuslientä (+41,5 °C / 20–24 h) NMKL 119:2007 -menetelmän mukaisesti. Lisäksi siirrostuksen onnistuminen varmistettiin tutkimalla näytteet suoralla kvantitoinnilla heti siirrostuksen jälkeen viljelemällä 100 µl pintalevityksenä kahdelle rinnakkaiselle mCCDA-maljalle (+41,5 °C / 48 h).

4.5 Säilyvyyskokeet maitosuodattimilla

C. jejuni -bakteerin säilyvyyttä maitosuodattimissa tutkittiin näytteiden lähetystä simuloivassa kokeessa neljällä eri säilytysajalla sekä neljällä siirroksen pitoisuudella. Matriisina käytettiin puolitettuja, tilan A automaattilypsyssä käytettyjä maitosuodattimia (Kuva 1).



Kuva 1. Automaattilypsylaitteiston maitoputkiston alkuosassa sijaitsevat maitosuodattimet (a ja b) leikattiin pitittäissuunnassa puoliiksi steriileillä saksilla (c) säilyvyyskoetta varten.

Suodattimet kerättiin tilalla Minigrip-pusseihin, joihin lisättiin kostutukseksi 5 ml 0,1 % steriiliä peptonisuolaliuosta. Toiset puolet suodattimista tutkittiin kampylobakteerien osoitusmenetelmällä (NMKL 119:2007) ja todettiin, ettei niissä esiinny lämpökestoisia kampylobakteereita. Jäljelle jääneet puolikkaat pakattiin yksittäin steriileihin verkkopusseihin ja pakastettiin (−80 °C).

Suodattimet sulatettiin yön yli kylmiössä (+6 °C), minkä jälkeen niihin siirrostettiin tilan B raakamaidosta eristettyä *C. jejuni* -epidemiakantaa (HMIK-909). Siirrostus tehtiin neljällä eri tasolla siten, että ensimmäinen taso (0-taso) ei sisältänyt *C. jejuni* -bakteeria, toinen sisälsi 10^2 pmy / ml, kolmas 10^3 pmy / ml ja neljäs 10^4 pmy / ml. Ensimmäisen tason näytteisiin lisättiin siirroksen sijaan puskuroitua peptonisuolaliuosta (Dilucup). Siirros valmistettiin kasvattamalla *C. jejuni* -bakteerikantaa mikroaerobisesti (+41,5 °C / 24 h; 5 % O₂, 10 % CO₂) 10 ml:ssa Brusella-rikastuslientä. Kasvatusliemestä tehtiin laimennussarja peptonisuolaliuokseen (Dilucup & Dilushaker III, Lab Robot, Ruotsi). Siirrostus tehtiin lisäämällä yksi ml laimennoksia 10^{-6} , 10^{-5} ja 10^{-4} sekä puskuroitua peptonisuolaliuosta suoraan verkkopusseissa oleviin suodattimiin. Pusseja puristeltiin varovasti, jotta siirros leviäisi kaikkialle suodattimeen. Siirrostettujen suodattimien annettiin seistä jääkaapissa (+6 °C) 30 minuuttia. Siirroksen todellisen *C. jejuni*-pitoisuuden varmistamiseksi viljeltiin laimennussarja veriagarimaljoille (+41,5 °C / 48 h) ja laskettiin pesäkelaskentamenetelmällä.

Suodattimet tutkittiin 30 minuutin, 24 tunnin, 48 tunnin ja 72 tunnin kuluttua siirrostuksesta. Puolen tuntia siirrostuksen jälkeen tutkittavia lukuun ottamatta suodattimet pakattiin kylmävaraajilla ja selluloosavanulla varustettuihin pieniin kylmälaukkuihin (koko 25 cm x 19 cm x 20 cm). Kylmälaukut avattiin seuraavan kerran vasta, kun suodattimet tutkittiin. Suodattimet rikastettiin verkkopusseissa 225 ml:ssa Bolton-lientä (+41,5 °C / 24 h) NMKL 119:2007 -menetelmän mukaisesti. Eristetyt bakteerikannat tunnistettiin *Campylobacter* -sukuun kuuluviksi tutkimalla aerobikasvu (+37 °C / 24–48 h) sekä varmistamalla tyypillinen liikkuvuus mikroskopoimalla. Maitosuodatinten taustafloora tunnistettiin MALDI-TOF -laitteella.

4.6 Eristettyjen *C. jejuni* -kantojen genotyyppitys pulssikenttägeelelektroforeesilla

C. jejuni -bakteerikannat genotyyppitettiin pulssikenttägeelelektroforeesilla PulseNet-standardin (<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/campylobacter-pfge-protocol508c.pdf>)

mukaisesti (Ribot ym., 2001). Jokaisesta näytteestä genotyyppitettiin yksi tai kaksi eristettyä *C. jejuni* -kantaa.

4.6.1 DNA:n eristys

DNA:n eristystä varten puhdasviljelmistä valmistettiin 4 ml:aan fosfaattipuskuroitua saliniliuosta (phosphate-buffered saline [PBS]) (Oxoid Ltd., Iso-Britannia) solususpensiot, joiden sameus oli välillä 0,570–0,820, kun spektrofotometrin (Novaspec II Visible Spectrophotometer, Novaspec Inc., USA) aallonpituudeksi oli asetettu 610 nm. Steriileihin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin pipetoitiin 400 µl bakteerisuspensiota, 20 µl proteinaasi K -liuosta (20 mg / ml) sekä 400 µl agaroosigeeliä (1 % SeaKem Gold [Lonza, USA] 1x TE -puskurissa), jotka sekoitettiin varovasti, valettiin muotteihin ja annettiin jähmettyä kylmiössä (+6 °C).

Bakteerisolut hajotettiin vesihauteessa agaroosigeeliin valettuna 5 ml:ssa solujen liuotuspuskuria (cell solution buffer [CSB]) (Tris-HCL [Sigma-Aldrich, USA], EDTA [Sigma-Aldrich, USA], NaOH [J.T. Baker, USA]), joka sisälsi 20 mg / ml Proteinaasi K -entsyymiä (Sigma-Aldrich, USA) (+50 °C / 15–120 min; 150–175 rpm). Geelipalat pestiin kaksi kertaa steriilillä vedellä ja kolme kertaa 1x TE-puskurilla, minkä jälkeen ne säilytettiin kylmiössä (+6 °C) eppendorf-putkissa yhdessä millilitrassa 1 x TE-puskuria.

4.6.2 DNA:n pilkkominen ja erottelu agaroosigeelillä

Digestiota varten valmistettiin steriiliin veteen yhteensä 200 µl:n reaktioseos, joka sisälsi 20 µl digestiopuskuria 4, 2 µl naudan seerumin albumiinia (bovine serum albumin [BSA]) ja 20 yksikköä *Sma*I-restriktioentsyymiä (kaikki New England Biolabs Inc., USA). Reaktioseos jaettiin eppendorf-putkiin, joihin lisättiin geelipaloista leikatut, noin yksi mm leveät siivut ja inkuboitui +25 °C:ssa yön yli.

Erottelu varten valmistettiin 1 % agaroosigeeli (Seakem Gold, Lonza, USA) 0,5 x Tris-boraatti-EDTA (TBE) -puskuriin (Sigma-Aldrich, USA). Digestoidut geelisiivut ladottiin kampaan ja geeli valettiin kamman ympärille geelikaukaloon. Molekyylipainomarkkerina käytettiin *Xba*I-entsyymillä (Roche, Roche Diagnostics GmbH, Sveitsi) digestoitua *Salmonella* Braenderup H9812 -bakteerikantaa (ATCC BAA-664).

Jähmettynyt geeli ajettiin TBE-puskurissa ajoajan ollessa 18 h, pulssiajan 6,8–35,4 s, jännitteen 6 V ja lämpötilan +14 °C (CHEF-DR III, Bio-Rad, USA).

Geeliä värjättiin 30 minuuttia etidiumbromidi-liuoksessa (0,5 µg / ml) (Bio-Rad, USA) ja huuhdeltiin Milli-Q-vedellä. Lopuksi geeli kuvattiin UV-valossa (AlphaImager, Alpha Innotech, USA).

4.6.3 Tulosten käsittely Bionumerics-ohjelmalla

PFGE-geelit analysoitiin Bionumerics 6.5 -ohjelmalla (Applied Maths, Belgia). Profiilien samankaltaisuus määritettiin Dice coefficient -kertoimella käyttäen 0,5 % optimointia ja 1 % toleranssia Tenover ym. (1995) esittämien, yleisesti käytettyjen kriteerien mukaisesti.

4.7 Tulosten tilastollinen tarkastelu

Frekventistisen tilastotieteen väliestimaatit eivät aina toimi pienillä otoskoilla, kun taas bayesilaisessa posterioritodennäköisyyksiin perustuvassa estimoinnissa vastaavia rajoituksia otoskoolle ei ole. (Dunson, 2001)

Kampylobakteerien esiintyvyyden arviointiin karjassa käytettiin hypergeometrista jakaumaa, koska otos tehtiin ilman takaisinpanoa – kukin nauta tutkittiin vain kerran näytteenottokertaa kohden – ja otoskoko oli suuri suhteessa pieneen perusjoukkoon (Gelman ym., 2013). Priorijakaumana käytettiin tasajakaumaa ja posteriorijakauma laskettiin numeerisesti 100000-kertaisella Monte Carlo -simuloinnilla. Kampylobakteerien esiintyvyyttä lypsykarjatiloihin arvioitiin laskemalla posteriorijakauman moodi sekä 95 %:n tasahäntäinen luottamusväli.

Tilastollinen analyysi tehtiin R-ohjelman versiolla 3.0.2 (R Core Team, 2013).

5 Tulokset

5.1 *C. jejuni* -bakteerin esiintyminen maidossa ja ympäristönäytteissä

Tilan A raakamaidosta, maitosuodattimista tai ympäristönäytteistä ei todettu lämpökestoisia kampylobakteereita seurantajakson aikana. Meijeriin toimitettujen raakamaitoerien kokonaisbakteerimäärä oli 2000–4000 pmy / ml ja somaattisten solujen määrä 74 000–141 000 (Tiedonanto tuottajalta, 10.3.2013). Myöskään tilan C raakamaidosta tai maitosuodattimista ei todettu seurantajaksolla lämpökestoisia kampylobakteereita, mutta kolmesta kuudesta tutkitusta ympäristönäytteestä eristettiin *C. jejuni*. Kokonaisbakteerimäärä tilan C meijeriin toimitetuissa raakamaitoerissä oli seurantajaksolla 4000–21 000 pmy / ml ja somaattisten solujen määrä 71 000–119 000 (Tiedonanto tuottajalta, 12.3.2013).

Tilalla B todettiin *C. jejuni* ensimmäistä näytteenottokertaa lukuun ottamatta kaikista maitonäytteistä neljän kuukauden seurantajaksolla sekä kahdella näytteenotokerralla varsinaisen seurantajakson jälkeen (Taulukko 6 ja Kaavio 1). Maitosuodattimista taas todettiin *C. jejuni* kaikissa näytteenotoissa kolmea kertaa lukuun ottamatta.

Kokonaisbakteerien määrä tilan B maidossa oli seurantajaksolla 2000–15 000 pmy / ml ja somaattisten solujen määrä 115 000–237 000. Taulukosta 1 ja kaaviosta 1 ilmenee, että kokonaisbakteerimäärä maidossa laski maitoletkun uusimisen jälkeen sekä tammikuun puolivälissä toistuvien happopesujen jälkeen pysyen hyvin alhaisena helmikuun lopulle asti. *C. jejuni* -bakteerin pitoisuus maidossa oli alimmillaan 0,007 MPN / ml korkeimmillaan 35 MPN / ml, eikä happopesuilla ollut merkittävää vaikutusta pitoisuuteen.

Mahdollisen biofilmin muodostuksen selvittämiseksi tutkituista, maitoputkiston läpi juoksutetuista vesinäytteistä (8 litraa ja 12 litraa) ei todettu lämpökestoisia kampylobakteereita 24 tunnin ja 48 tunnin rikastusten jälkeen.

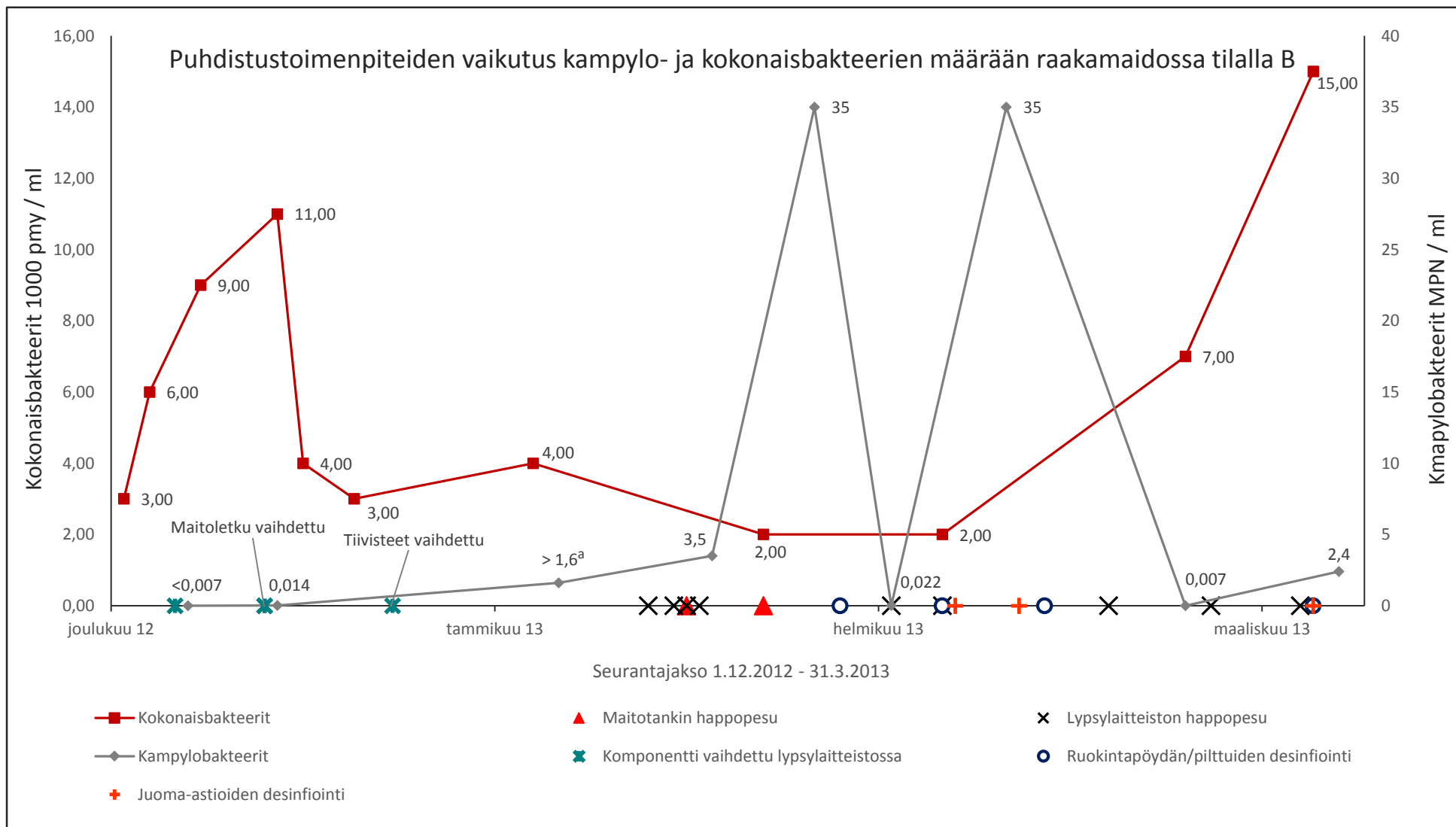
Taulukko 6. *C. jejuni* -bakteerin pitoisuus maidossa ja maitosuodattimissa sekä kokonaisbakteerien määrä maidossa seurantajaksolla ja sen jälkeen tilalla B.

	<i>Lypsylaitteiston happopesut</i>	<i>Maitotankin happopesut</i>	<i>Kampylobakteerit</i>			<i>Kokonaisbakteerit</i>	
	<i>Päivämäärä</i>	<i>Päivämäärä</i>	<i>Näytteenottopäivä</i>	<i>Maito MPN / ml [95 % luottamusväli]</i>	<i>Maitosuodattimet todettiin / ei todettu</i>	<i>Näytteenottopäivä</i>	<i>Maito pmy / ml</i>
<i>Seurantajaksolla (3 kk)</i>							
<i>1.12.2012–31.3.2013</i>							
						6.12.2012	3
						8.12.2012	6
			11.12.2012 ^a	< 0,007 [-;-]	Ei todettu (0 / 1 kpl)	12.12.2012	9
			18.12.2012 ^b	0,014 [0,00340;0,059]	Todettiin (1 / 4 kpl)	18.12.2012	11
						20.12.2012	4
						24.12.2012	3
			9.1.2013	> 1,6 ^c [-;-]	Todettiin (1 / 2 kpl)	7.1.2013	4
	16.1.2012						
	18.1.2012						
	19.1.2012	19.1.2012					
	20.1.2012		21.1.2013	3,5 [1,2;10,0]	Todettiin (2 / 2 kpl)		
		25.1.2013				25.1.2013	2
			29.1.2013	35 [12,0;100,0]	Todettiin (1 / 2 kpl)		
	4.2.2013		4.2.2013	0,022 [0,0065;0,072]	Todettiin (1 / 1 kpl)		
	8.2.2013					8.2.2013	2
	21.2.2013		13.2.2013	35 [8,9;64,0]	Ei todettu (0 / 2 kpl)		
	1.3.2013		27.2.2013	0,007 [0,001;0,049]	Todettiin (2 / 3 kpl)	27.2.2013	7
	8.3.2013		11.3.2013	2,4 [0,88;6,1]	Todettiin (1 / 2 kpl)	9.3.2013	15
	16.3.2013						
	23.3.2013						
	30.3.2013	30.3.2013					
<i>Seurantajakson jälkeen</i>							
<i>1.4.2013–26.6.2013</i>							
		8.4.2013					
	13.4.2013	13.4.2013					
	17.4.2013						
	22.4.2013						
			29.5.2013	> 0,064 [-;-]	Todettiin (1 / 1 kpl)		
			26.6.2013	> 0,064 [-;-]	Ei todettu (0 / 1 kpl)		

^a Näytteiden kuljetus kesti 72 tuntia ja kylmävaraajat olivat ehtineet lämmitä huoneenlämpöön

^b Näytteiden kuljetus kesti 48 tuntia ja kylmävaraajat olivat ehtineet lämmitä huoneenlämpöön

^c Näytettä ei laimennettu tarpeeksi, jotta pitoisuus maidosta olisi saatu määritettyä tarkemmin



^a Näytettä ei laimennettu tarpeeksi.

Kaavio 1. Puhdistustoimenpiteiden vaikutus maidon kampylo- ja kokonaisbakteerien määrään seurantajaksolla 1.12.2012–31.3.2013 tilalla B.

Ympäristönäytteistä todettiin *C. jejuni* ruokintapöydältä, pesuveden poistoputkesta, tankkihuoneen lattiakaivosta sekä pesemättömästä lypsyliinasta (Taulukko 7).

Taulukko 7. *C. jejuni* -bakteerin esiintyminen ympäristönäytteissä tilalla B

Näytteenottopäivä	Näyte	Näytteiden lukumäärä (kpl)	Kampylobakteerien toteaminen / Näyte
11.12.2012 ^a	Vesikupit	8	Ei todettu
	Lypsyliina	1	Ei todettu
9.1.2013	Maitoputken hana	8	Ei todettu
21.1.2013	Vesikupit	10	Ei todettu
	Ruokintapöydät	6	1 / 6 näytteestä todettiin <i>C. jejuni</i>
	Vasikoiden ruokintaämpärit	1	Ei todettu
	Rehuvaunu	2	Ei todettu
	Vasikoiden vesinipat	1	Ei todettu
	Pesuveden poistoputki	1	Todettiin <i>C. jejuni</i>
	Tankkihuoneen lattiakaivo	1	Todettiin <i>C. jejuni</i>
4.2.2013	Vedinkumien sisäpinnat	6	Ei todettu
11.3.2013	Vedinkumien sisäpinnat	6	Ei todettu
	Pesemätön lypsyliina	1	Todettiin <i>C. jejuni</i>

^a Näytteiden saapuminen laboratorioon kesti 72 tuntia.

5.2 *C. jejuni* -bakteerin esiintyminen ja genotyyppijakauma tiloilla

Tiloilla B ja C yli puolet karjasta eritti ulosteeseen lämpökestoisia kampylobakteereita, (Taulukko 8). Kaikki tiloilta eristetyt lämpökestoiset kampylobakteerit tunnistettiin *C. jejuni* -bakteereiksi lukuun ottamatta tiloilta A ja B eristettyjä *C. hyointestinalis* -bakteereita.

Taulukko 8. *Kampylobakteerien esiintyminen lypsykarjassa tiloilla A, B ja C*

<i>Tila</i>	<i>Näytteenotto- kerta</i>	<i>Karjan koko</i>	<i>Positiivisia / Tutkittu näyttemäärä (kpl)</i>	<i>Todennäköisin esiintyvyys karjassa (posteriorijakauman moodi)</i>	<i>Esiintyvyyden väliestimaatti [posteriorijakauman 95 % luottamusväli]</i>
A	4.12.2012	46	1 / 15	2	[1;12]
	3.1.2013		6 ^a / 15	18	[10;28]
B	11.12.2012	40	11 / 19	22	[17;29]
	21.1.2013		15 ^b / 20	31	[24;34]
C	28.1.2013	80	14 / 20	57	[41;67]

^a Neljä eristetyistä *kampylobakteerikannoista* tunnistettiin *C. hyointestinalis* -bakteereiksi.

^b Yksi eristetyistä *kampylobakteerikannoista* tunnistettiin *C. hyointestinalis* -bakteeriksi..

Tilan B molemmissa ulostenäytteenotoissa tutkituista viidestä naudasta kahden ulosteista ei todettu *kampylobakteereita* ensimmäisessä näytteenotossa, mutta toisella kerralla todettiin *C. jejuni* ja *C. hyointestinalis* (Taulukko 9). Kaikki naudat, joiden ulosteesta todettiin *C. jejuni* ensimmäisessä näytteenotossa, antoivat positiivisen näytteen myös toisella näytteenottokerralla.

Tilalta B todettiin kaikkiaan kahdeksan, eri *SmaI*-tyyppejä edustavaa *C. jejuni* -kantaa, joista seitsemän eristettiin nautojen ulostenäytteistä ja yksi ympäristönäytteistä. Näistä S11 oli vallitseva tyyppi (43 %) tilalla. Muut tyypit olivat selkeässä vähemmistössä tutkituissa tilan naudoissa (S17 4 %, S23 17 %, S24 17 %, S55 9 %, S70 4 % ja S179 4 %). Tyyppi S30 todettiin vain lypsyliinasta, muttei ulosteista. Lypsyliinaa lukuun ottamatta seurantajakson aikana ja sen jälkeen maito-, maitosuodatin- ja ympäristönäytteistä todetut *C. jejuni* -kannat olivat kaikki samaa vallitsevaa *SmaI*-tyyppiä S11.

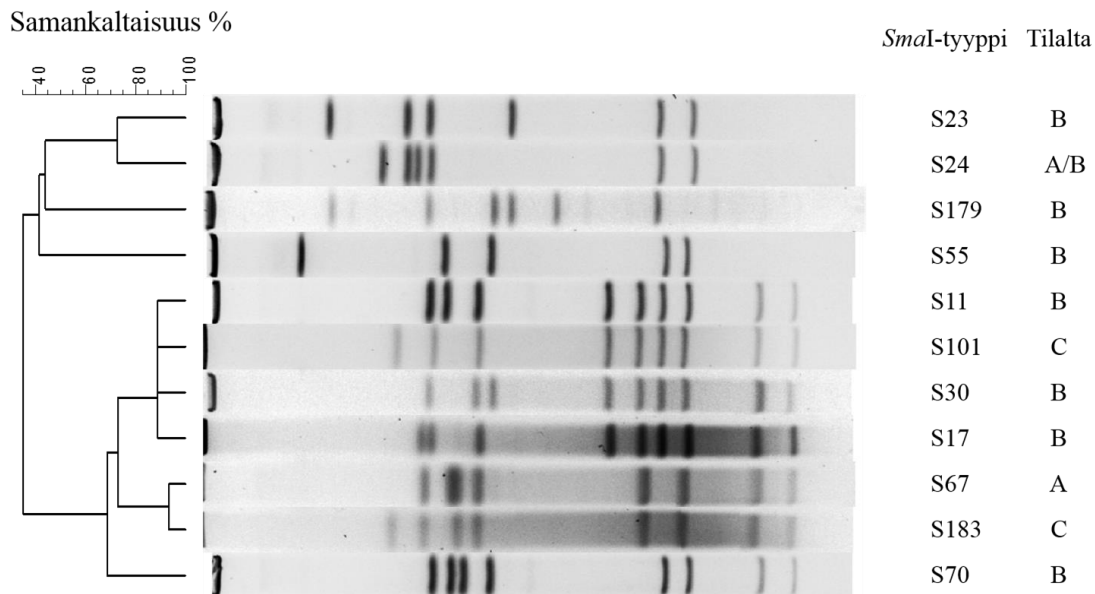
Taulukko 9. *Campylobacter* esiintyminen tilan B nautojen ulostenäytteissä sekä ulosteista eristettyjen *C. jejuni* -kantojen genotyypit *SmaI* -entsyymillä pilkottuna.

11.12.2012 otetut ulostenäytteet			21.1.2013 otetut ulostenäytteet		
Naudan tunniste	<i>Campylobacter</i> in toteaminen / 10 g	<i>SmaI</i> -tyyppi	Naudan tunniste	<i>Campylobacter</i> in toteaminen / 10 g	<i>SmaI</i> -tyyppi
003	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11	002	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S24
005	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11	004	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S17
007	Ei todettu		005	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11
008	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S70	018	Ei todettu	
013	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S23	025	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11
018	Ei todettu		027	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S23
022	Ei todettu		030	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11
036	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11	035	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11
037	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11	037	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11
038	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S24	040	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S23
154	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S55	042	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S179
239	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11	052	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S23
297	Ei todettu		075	Ei todettu	
369	Ei todettu		297	Todettiin <i>C. hyointestinalis</i>	-
395	Ei todettu		305	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S24
438	Ei todettu		338	Ei todettu	
439	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11	369	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S24
441	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S55	417	Ei todettu	
589	Ei todettu		435	Todettiin <i>C. jejuni</i>	S11
			438	Ei todettu	

Campylobacter sp. yhteensä 24 / 34

Näytteet otettiin samasta eläimestä kahdella eri näytteenotokerralla.

Tiloilta A, B ja C todettiin yhteensä 11 eri *SmaI*-tyyppiä edustavaa *C. jejuni* -kantaa (Kuva 2). Tilan A naudoista eristettiin kolme *C. jejuni* -kantaa, joista kaksi edustivat *SmaI*-tyyppiä S67 ja yksi oli tyyppiä S24. Tilan C ympäristönäytteistä eristetyt kannat olivat kaikki tyyppiä S101. Ulostenäytteistä taas 79 % oli tyyppiä 101 ja 21 % tyyppiä S183. Tyyppi S24 eristettiin sekä tilalta A että B.



Kuva 2. Tiloilta A, B ja C eristettyjen *C. jejuni* -kantojen PFGE-profiilit *SmaI*-entsyymillä pilkottuna ja Dice coefficient -kertoimella (optimointi 0,5 %; toleranssi 1%) määritetyllä samankaltaisuudella dendrogrammiksi järjestettynä.

5.3 Tilalta B eristettyjen *C. jejuni* -kantojen säilyvyys raakamaidossa

Tilalta B eristetyillä *C. jejuni* -kannoilla tehdyssä säilyvyyskokeessa raakamaidosta eristetty epidemiatyyppi S11 säilyi maidossa pisimpään; se todettiin maidosta vielä 96 tunnin kuluttua siirrostuksesta. Ulosteista eristetyt kolme muuta tyyppiä eivät olleet todettavissa enää 48 tuntia ja yksi ulostetyyppi 72 tuntia siirrostuksen jälkeen (Taulukko 10).

Taulukko 10. Viiden, tilalta B eristetyn, eri *SmaI*-tyyppejä edustavan *C. jejuni* -kannan säilyvyys raakamaidossa.

Positiivisia / tutkittujen näytteiden lukumäärä / MPN / ml / 95 % luottamusväli													
C. jejuni -kanta (SmaI-tyyppi)	Näyte	Pitoisuus maidossa pmy / ml	Säilytysaika (+4 °C)										
			24 h			48 h			72 h			96 h	
HMIK-909 (S11)	A	27	3 / 5	0,037	[0,011;0,12]	1 / 5	0,0089	[0,0013;0,064]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089 [- ; -]
	B	27	2 / 5	0,02	[0,005;0,083]	2 / 5	0,02	[0,005;0,083]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	1 / 5	0,0089 [0,0013;0,064]
HMIK-12121 (S70)	A	15	5 / 5	> 0,064	[- ; -]	3 / 5	0,037	[0,011;0,12]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089 [- ; -]
	B	15	4 / 5	0,064	[0,022;0,19]	2 / 5	0,02	[0,005;0,083]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089 [- ; -]
HMIK-12122 (S23)	A	25	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089 [- ; -]
	B	25	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089 [- ; -]
HMIK-12127 (S24)	A	150	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089 [- ; -]
	B	150	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089 [- ; -]
HMIK-12135 (S55)	A	18	5 / 5	> 0,064	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089 [- ; -]
	B	18	5 / 5	> 0,064	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089	[- ; -]	0 / 5	< 0,0089 [- ; -]

5.4 *C. jejuni* -bakteerin säilyvyys maitosuodattimissa

Maitosuodatinten kylmälaukkukuljetusta simuloineessa säilyvyyskokeessa *C. jejuni* -bakteeria ei todettu enää 48 tunnin säilytyksen jälkeen siirroksen pitoisuuksilla 10^2 ja 10^3 , mutta pitoisuudella 10^4 vielä 72 säilytyksen jälkeen (Taulukko 11). Maitosuodattimista eristettiin myös gramnegatiivinen ja oksidaasi-negatiivinen sauvabakteeri, joka tunnistettiin *Acinetobacter* -suvun lajiksi (MALDI-TOF).

Taulukko 11. *C. jejuni* -bakteerin (HMIK-909) säilyvyys maitosuodattimissa.

Siirroksen koko (pmy / puolitettu maitosuodatin)	Positiivisia / tutkittujen näytteiden lukumäärä			
	Säilytysaika ja -lämpötila			
	30 min / + 4 °C	24 h / +25 °C	48 h / + 25 °C	72 h / + 25 °C
0	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
2,47–4,05 x 10^2	2 / 3 ^a	2 / 3 ^a	0 / 3	0 / 3
2,47–4,05 x 10^3	3 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3
2,47–4,05 x 10^4	3 / 3	3 / 3	2 / 3 ^a	2 / 3 ^a

^a Näytteissä, joissa *C. jejuni* -bakteeria ei todettu, oli runsas epätyypillinen kasvu mCCD-agarmaljalla.

6 Tulosten tarkastelu

6.1 *C. jejuni* -bakteerin esiintyminen tilojen raakamaidossa

Kampylobakteerien aiheuttamat raakamaitovälitteiset epidemiat ovat pohjoismaissa olleet yleensä pienimuotoisia, ja rajoittuneet maitotilan työntekijöihin ja perhepiiriin (Schildt ym., 2006; Hansson ym., 2013). Näin oli myös tilan C tapauksessa, jossa neljä tilan työntekijää sairastui kampylobakterioosiin. Aiheuttajaksi todettiin raakamaito epidemiologisen näytön perusteella.

Tilalla B raakamaito aiheutti laajemman, useita perheitä koskettaneen epidemian, jonka aikana yhteensä 18 ihmistä sai ripuli-oireita juotuaan tilan raakamaitoa tai vierailtuaan tilalla. Neljä ripulioireita saaneesta ei kuitenkaan ollut juonut raakamaitoa

kuumentamattomana, mutta yksitoista ilmoitti olleensa suorassa kontaktissa nautoihin (Epidemiaselvitysraportti A, 2013). Epidemiaselvitysraportissa ei eritelty olivatko maitoa juomattomat henkilöt olleet eläinkontaktissa, mutta mahdollinen selitys heidän sairastumiselleen voi olla suora eläinkontakti, joka on todettu kampylobakterioosin riskitekijäksi ja vastaavia tartuntoja on raportoitu (Kapperud ym., 2003; Potter ym., 2003; Heuvelink ym., 2009).

Tilan C maidosta sekä lypsyrobotista ja automaattilypsystä kerätyistä maitosuodatinnäytteistä eristettiin *C. jejuni* heti epidemian jälkeen, mutta ei kuitenkaan enää kuusi viikkoa kestäneen seurantajakson aikana. Tilalla B taas todettiin harvinainen raakamaidon pitkittynyt kampylobakteerikontaminaatio. Maitonäytteistä sekä suurimmasta osasta tutkittuja maitosuodattimia todettiin genotyyppiä S11 edustanut *C. jejuni* jokaisessa seurantajakson näytteenotossa ensimmäistä lukuun ottamatta – vielä puoli vuotta epidemian jälkeenkin. Sama, potilaskantaa vastaava *SmaI*-tyyppi oli todettu maidosta ja maitosuodattimista myös epidemianselvityksen yhteydessä.

Elintarvikkeiden kampylobakteerikontaminaatio on aina alkujaan ulosteperäinen, sillä bakteerin luontainen elinympäristö on lämminveristen eläinten suolisto, eikä se pysty lisääntymään isäntäeläimen ulkopuolella (Park, 2002; Stanley & Jones, 2003). Molemmilla epidemiatiloilla B ja C arviolta yli puolet tutkituista naudoista eritti *C. jejuni* -bakteeria ulosteeseen. Sen sijaan kontrollitilalla A, jolla ei ollut epidemiaa ja jolla kampylobakteereita ei todettu maidosta tai maitosuodattimista seurantajaksolla, esiintyvyys naudoissa oli alhainen.

Tilojen B ja C maidosta ja maitosuodattimista epidemianselvityksen yhteydessä ja seurantajakson aikana todetut *C. jejuni* -kannat olivat tilojen naudoissa vallitsevaa genotyyppiä. Kampylobakteerien korkea esiintyminen karjassa viittaa kontaminaation olevan peräisin nautojen ulosteesta molemmilla epidemiatiloilla. Ulostesaastutuksen onkin todettu olevan yleisin syy raakamaidon kontaminoitumiseen kampylobakteereilla (Waterman ym., 1984; Oliver ym., 2005; Schildt ym., 2006; Ruusunen ym., 2013).

Suoran ulostesaastutuksen lisäksi raakamaito saattaa saastua myös välillisesti esimerkiksi lypsylaitteiston pesuvetenä käytetyn kampylobakteerien kontaminoiman talousveden välityksellä. Kummankaan tilan talousvedestä ei kuitenkaan todettu epidemianselvityksen yhteydessä kampylobakteereita (Epidemiaselvitysraportti A, 2013; Epidemiaselvitysraportti B, 2013).

Raakamaidon suoran ulostesaastutuksen mahdollisia aiheuttajia ovat voineet olla viat tai häiriöt lypsylaitteistossa sekä huono lypsyhygienia. Tilalla C ei epidemian-

selvitysraportin mukaan havaittu putkirikkoja tai muita kontaminaatiolle altistavia ongelmia ennen epidemiaa. Yleistä hygieniatasoa indikoivat kokonaisbakteerimäärät olivat myös alhaiset sekä ennen epidemiaa että seurantajakson aikana (osaa tiedoista ei esitetty). Koska epidemia oli lyhytkestoinen, eikä maidosta eristetty *C. jejuni* -bakteeria enää seurantajakson aikana, kontaminaatio oli todennäköisesti seurausta hetkellisestä huonosta lypsyhygieniasta.

Tilalla C oli lypsyaseman ohella automaattilypsy, jonka käyttö saattaa mahdollisesti lisätä raakamaidon kontaminoitumisen riskiä. Automaattilypsyssä ihminen ei tarkasta vedinten puhtautta ennen lypsinten kiinnittämistä, mikä saattaa lisätä ulostesaastutuksen mahdollisuutta. Automaattilypsytön on todettu lisäävän useiden hygieniaindikaattorien määrää maidossa, jolloin myös riski patogeenien esiintymisestä maidossa saattaa kasvaa (Klungel ym., 2000; Rasmussen ym., 2002; de Koning ym., 2003; Salovuori ym., 2005; Maitohygienialiitto, 2014).

Toisaalta hyvätkään hygieniakäytännöt eivät aina estä pienten ulostemäärien joutumista maitoputkistoon (Ruusunen ym., 2013). Lihakarjan on todettu erittävän *C. jejuni* -bakteeria ulosteeseen 5×10^5 pmy / g, maitokarjan $1,1 \times 10^2$ pmy / g ja vasikoiden $2,7 \times 10^4$ pmy / g, jolloin yksi gramma ulostetta voi riittää saastuttamaan keskisuuren tilan tilatankillisen (5000 l) maitoa kokeellisesti infektiiviseksi todettuun pitoisuuteen 500 pmy / ml (Robinson, 1981; Inglis ym., 2004; Nielsen, 2002). Tosin epidemioiden yhteydessä kerättyä dataa mallintamalla on saatu viitteitä, että riskiryhmiin kuuluvat ihmiset voivat saada oireita jo paljon pienemmilläkin kerta-annoksilla (Riordan ym., 1993; Teunis ym., 2005).

Tilalla B taas todettiin poikkeuksellisen pitkäkestoinen raakamaidon kampylobakteerikontaminaatio. Schildt ym., (2006) raportoivat vastaavanlaisesta pitkittyneestä kontaminaatiosta, jonka aiheuttajaksi paljastuivat lypsylaitteistoon huonosti asennetut vedinkumit. Asennusvirheen seurauksena maitoon pääsi vuotavien vedinkumien kautta kampylobakteereita lannan käsittelyn yhteydessä muodostuneissa aerosoleissa. Vedinkumien vaihtamisen jälkeen maidosta ei enää todettu kampylobakteereita.

Tilalla B ei ollut tapahtunut kuitenkaan mitään tavallisuudesta poikkeavaa ennen epidemiaa (Epidemianselvitysraportti A, 2013). Heti seurantajakson alussa tilalla uusittiin tiivisteitä ja maitoletku sekä muita mahdollisesti hygieniaan vaikuttaneita maitolaitteiston osia, mikä ei kuitenkaan poistanut maidon kontaminaatiota. Jatkuva ulostesaastutus lypsytön yhteydessä olisi myös todennäköisesti nostanut tilatankkimaidon kokonaisbakteerimääriä, jotka olivat pääosin hyvin alhaiset sekä epidemian aikana että

sen jälkeen seurantajaksolla (tietoja ei esitetty). Näin ollen ulosteen kulkeutumista maitoon aiheuttava vika tai häiriö lypsylaitteistossa ei vaikuta todennäköiseltä selitykseltä pitkittyneeseen kontaminaatioon.

Vaikka lypsylaitteisto toimisikin moitteettomasti, maitoon saattaa lypsyn yhteydessä päätyä pieniä määriä ulostetta likaisista vetimistä. Mahdollinen selitys maidon pitkittyneelle kontaminaatiolle voisi olla yhden tai useamman naudan poikkeuksellisen runsas kampylobakteerien erityys ulosteeseen. ”Supererittäjiksi” kutsuttujen nautojen on raportoitu erittävän *C. jejuni* -bakteereita ulosteeseen jopa 10^5 – 10^6 pmy / g, jolloin hyvinkin pieni ulostemäärä vetimien pinnalla riittäisi saastuttamaan maidon (Inglis ym., 2004; Hakkinen & Hänninen, 2009; Rapp ym., 2012). Ulosteen tavallista korkeampi *C. jejuni* -pitoisuus voisi selittää myös maidosta kahdessa näytteenotossa todetun verrattain korkean *C. jejuni* -bakteerien määrän, 35 MPN / ml. Aiemmissä tutkimuksissa raakamaidosta raportoidut *C. jejuni* -pitoisuudet ovat olleet pääosin pieniä, alle 1 pmy / ml (Heuvelink ym., 2009; Giacometti ym., 2012a).

Tutkimuksessa ei määritetty nautojen ulostenäytteiden kampylobakteeripitoisuutta. Nautojen kohonneiden eritysmäärien ja erityksen ylipäättään on kuitenkin todettu olevan ajoittaista, mikä ei tue oletusta jatkuvasta ulostesaastutuksesta (Humphrey & Becket, 1987; Inglis ym., 2004; Hakkinen & Hänninen, 2009; Rapp ym., 2012). Lisäksi kontaminaatio säilyi tilan B maidossa poikkeuksellisen pitkään tehostetuista hygieniakäytännöistä sekä puhdistus- ja saneeraustoimenpiteistä huolimatta, mikä herätti epäilyksen, että raakamaidon pitkittyneen kontaminaation aiheuttaja oli mahdollisesti jokin muu kuin suora ulostesaastutus.

6.2 Maidon kontaminoituminen ja puhdistustoimenpiteet tilalla B

Seurantajakson aikana ja sen jälkeen tilalla B tehtiin lukuisia puhdistus- ja saneeraustoimenpiteitä *C. jejuni* -kontaminaation poistamiseksi raakamaidosta ja ympäristöstä. Maidon *C. jejuni* -pitoisuus vaihteli huomattavasti kyseisenä ajanjaksona ollen välillä hyvinkin korkea, 35 MPN / ml. Happopesuilla ja pesuveden lämpötilan nostolla ei kuitenkaan vaikuttanut olevan merkittävää vaikutusta *C. jejuni* -bakteerien määrään maidossa, vaikka käsittelyt olivat kyllin voimakkaat putkistossa mahdollisesti olevien kampylobakteerien eliminoimiseksi. Tammikuun puolivälissä päivittäin tehtyjen happopesujen jälkeen maidon *C. jejuni* -pitoisuus jopa nousi. Kokonaisbakteerimäärä

säännöllisten happopesujen aikaan oli kuitenkin alimmillaan 2000 pmy / ml, mikä indikoi erinomaista hygieniatasoa.

Mahdollinen selitys epidemiakannan kestävyys vastaan ja samalla raakamaidon pitkäkestoiseen kontaminaatioon voisi olla biofilmin muodostuminen maitoputkistoon. Desinfektioaineiden teho biofilmin sisällä olevia bakteerisoluja vastaan on usein heikentynyt, koska orgaaninen aines, kuten rasva ja proteiinit sekä bakteerien tuottamat eksopolysakkaridit suojaavat niitä (Simões ym., 2006; Simões ym., 2010). Biofilmien onkin kasvutapana todettu edistävän kampylobakteerien selviytymistä ja suojaavan puhdistusaineilta sekä epäedullisilta ympäristöoloilta, kuten hapelta (Joshua ym., 2006; Nikolaev & Plakunov, 2007; Trachoo & Frank, 2002; Trachoo ym., 2002). Kampylobakteerien ei ole kuitenkaan raportoitu muodostaneen biofilmejä maitoputkistoihin, mutta liemiviljelmissä tehtyjen tutkimusten perusteella se pystyy sekä kolonisoimaan valmiita biofilmejä että muodostamaan niitä itsenäisesti objektilasille ja ruostumattoman teräksen pintaan +30 °C:ssa ja +37 °C:ssa inkuboituna (Joshua ym., 2006; Hanning & Slavik, 2009; Nereus & Chin-Yi., 2009). Aerobisten olojen on lisäksi raportoitu kiihdyttävän *C. jejuni* -bakteerin biofilmin muodostusta (Reuter ym., 2010). Raakamaidon lämpötila on lypsetäessä noin +35 °C, ja jos tilalla on ollut käytössä vasta tilatankissa jäähdyttävä lypsylaitteisto, maidon lämpötila olisi ollut riittävän korkea biofilmin muodostamiseen ainakin putkiston alkuosassa. Toisaalta Joshuan ym. (2006) tutkimuksessa *C. jejuni* muodosti biofilmiä ainoastaan staattisissa, muttei virtaavissa kasvatusoloissa, mikä ei tue teoriaa sen itsenäisestä biofilmin muodostamisesta maitoputkistoon. Maitoputkistoista on kuitenkin eristetty monilajisia biofilmejä, joita *C. jejuni* voisi ainakin teoriassa kolonisoida (Ksontini ym., 2013).

Epidemiakanta S11 eristettiin maituhuoneen lattiakaivon pinnalta sekä lypsylaitteiston pesuveden poistoputken sisäosan yläpinnalta, jonne huuhteluvesi ei ulottunut. *C. jejuni* -bakteerien selviämistä putken pinnan ja lattiakaivon hapellisissa oloissa saattoivat edesauttaa pinnalle kertyneiden maidon rasvan ja proteiinien tai vaihtoehtoisesti biofilmin suojaava vaikutus. Epidemiakanta S11 osoittautui myös poikkeuksellisen kestäväksi verrattuna neljään muuhun tilalla esiintyvään *C. jejuni* -kantaan. Se todettiin säilyvyyskokeessa ainoana raakamaidosta vielä 96 tunnin kuluttua siirrostuksesta. Onkin mahdollista, että kyseisellä kannalla on stressinsietokykyä parantavia ominaisuuksia, joita muilla tilalla esiintyvillä *C. jejuni* -kannoilla ei ole. Tämä saattaisi selittää, miksi ympäristönäytteistä ei eristetty muita genotyyppisiä kuin S11.

Tilan B maitoputkistossa mahdollisesti kasvavasta biofilmistä yritettiin ottaa näyte juoksuttamalla vettä putkiston läpi kiertopesun jälkeen. Vesinäytteistä ei kuitenkaan todettu lämpökestoisia kampylobakteereita kummallakaan näytteenottokerralla. Voi olla, että vettä ei juoksutettu tarpeeksi kovalla paineella, jotta putken sisäpinnalta olisi irronnut kertymiä veteen. Parempi tapa olisikin ollut ottaa pintasivelynäyte putkiston sisäpinnalta. Se ei kuitenkaan ollut mahdollista, sillä putkistoa olisi täytynyt purkaa näytteenottoa varten. Toisaalta, jos veden virtaus ei näytteenotossa ollut tarpeeksi voimakas irrottamaan putkiston biofilmikertymiä, vaikuttaa epätodennäköiseltä, että kertymiä irtoaisi myöskään lypsyn yhteydessä jatkuvasti maitoon.

Vaihtoehtoinen selitys maidon pitkäaikaiselle kontaminaatiolle voi olla kampylobakteerien erittyminen suoraan maitoon. Tutkijat ovat viime vuosina raportoineet kolmesta raakamaidon pitkittyneestä kontaminaatiosta Italiassa, joiden aiheuttajiksi paljastuivat yhden naudan yhden utarelohkon oireettomat utaretulehdukset (Luini ym., 2009; Bianchini ym., 2014). Kun kyseisten yksilöiden lypsäminen tilatankkiin lopetettiin, *C. jejuni* -bakteereita ei enää todettu maidosta. Kaikissa tapauksista yhden lehmän yksi tulehtunut utarelohko riitti kontaminoimaan tilatankillisen maitoa, vaikka lypsäviä lehmiä oli 165–270 (Luini ym., 2009; Bianchini ym., 2014). Yhden sairaista lehmistä todettiin erittävän *C. jejuni* -bakteeria maitoon jopa 275 MPN / ml (Luini ym., 2009).

Toisessa Luinin ym. (2009) raportoimista tapauksista oireettomaan utaretulehdukseen liittyneen *C. jejuni*-erityksen maitoon todettiin kestäneen ainakin 90, mutta mahdollisesti jopa 120 vuorokautta, minkä jälkeen tulehdus hoidettiin antibiooteilla. Tilalla B taas sama *C. jejuni*-genotyyppi S11 todettiin maidosta vielä yli 180 vuorokautta epidemian jälkeen. Koska Luinin ym. (2009) raportoimassa tapauksessa utaretulehdus ei kuitenkaan parantunut itsestään ja kontaminaatio poistui vasta antibiootitihoon jälkeen, on mahdollista, että myös tilalla B pitkittyneen kontaminaation aiheutti hoitamaton *C. jejuni* -bakteerin aiheuttama utaretulehdus. Somaattisten solujen määrä tankkimaidossa oli kuitenkin alhainen, eikä viitannut utaretulehdukseen. Toisaalta, jos utaretulehduksesta kärsiviä nautoja oli vain yksi, saastunut maito laimeni tilatankissa, eikä todennäköisesti nostanut tankkimaidon solulukua huomattavasti. Myös Luinin ym. (2009) kuvaamassa tapauksessa somaattisten solujen määrä tankkimaidossa pysyi alhaisena.

Kaikissa raportoiduissa tapauksissa, joissa *C. jejuni* -bakteereita on erittynyt suoraan maitoon, utaretulehdus on ollut oireeton (Hutchinson ym., 1985; Orr ym., 1995;

Luini ym., 2009; Bianchini ym., 2014). Onkin mahdollista, ettei kyseessä ole tällöin ollut varsinainen immuunivälitteinen tulehdus, vaan *C. jejuni* on kolonisoinut vedinkanavan aiheuttamatta tulehdusreaktiota. Vedinkanavassa on todennäköisesti alentunut happitaso, mikä tekisi siitä soveltuvan elinympäristön mikroaerofiiliselle *C. jejuni* -bakteerille. Kokeellisesti *C. jejuni* -bakteereilla aiheutetuissa utaretulehduksissa vetimissä on ilmennyt ulkoisesti havaittavia tulehduksen merkkejä, kuten turvotusta, kuumotusta sekä arkuutta, ja myös maidon koostumus on muuttunut kokkareiseksi ja kellertäväksi (Lander & Gill, 1980). Italiassa raportoiduissa tapauksissa taas ulkoisia merkkejä tulehduksesta ei havaittu, mikä voisi viitata vedinkanavan kolonisoitumiseen infektioitumisen sijaan (Hutchinson ym., 1985; Orr ym., 1995; Luini ym., 2009; Bianchini ym., 2014).

6.3 Kampylobakteerien esiintyminen ja genotyyppijakauma tiloilla

Kampylobakteerien esiintyvyys oli korkein epidemiatiloilla B ja C, joilla todennäköisin esiintyvyys oli yli 50 % lypsävistä lehmistä. Tilalla A taas kampylobakteerien esiintyvyys vaihteli huomattavasti; ensimmäisen näytteenoton perusteella todennäköisin esiintyvyys 46 naudan karjassa oli kaksi positiivista yksilöä, kun taas toisen näytteenoton perusteella 18 positiivista yksilöä.

Tiloilta ei eristetty muita lämpökestoisia kampylobakteerilajeja kuin *C. jejuni*, vaikka muissa tutkimuksissa sekä Suomessa että muualla on todettu myös *C. coli* -bakteereita – kuitenkin vain vähemmistönä (Minihan ym., 2004; Hakkinen & Hänninen, 2009). Neljä tilalta A ja yksi tilalta B eristetyistä kampylobakteerikannoista tunnistettiin *C. hyointestinalis* -bakteereiksi, joita esiintyy yleisesti etenkin vanhempien nautojen suolistossa (Giacoboni ym., 1993; Hakkinen ym., 2007).

Tilalta A eristettiin kaksi eri *Sma*I-tyyppiä edustavaa *C. jejuni* -bakteerikantaa, tilalta B kahdeksan ja tilalta C kaksi. Tilalta B eristetty tyyppi S30 tosin todettiin ainoastaan pesemättömästä lypsyliinasta, muttei ulosteista. Lypsyliinasta eristetyt *C. jejuni* -bakteerit ovat kuitenkin todennäköisesti ulosteperäisiä, sillä liinaa käytettiin vedinten puhdistamiseen ulosteesta ja roskista ennen lypsinten kiinnittämistä.

Koska epidemiatiloilta epidemianselvityksen yhteydessä eristetyt *C. jejuni* -kannat todettiin identtisiksi sekä *Sma*I- että *Kpn*I -entsyymeillä tyypitettynä, seurantajaksolla eristettyjä kantoja ei katsottu tarpeelliseksi tyypittää *Kpn*I:llä. On kuitenkin mahdollista, että tyypitettäessä *Kpn*I:llä olisi löydetty useampia genotyypejä.

Vaikka tiloilla esiintyykin yleensä useita eri genotyyppisiä, on tavallista, että joku tyypeistä on vallitseva kuten tyyppi S11 tilalla B ja S101 tilalla C (Nielsen, 2002; Hakkinen & Hänninen, 2009; Rapp ym., 2012). Kyseiset genotyypit eristettiin myös tilalla B ruokintapöydältä ja tilalla C nautojen juoma-astioista, joiden kautta tartunta on voinut levitä karjassa tehokkaasti. Ruokintapöydälle *C. jejuni* on voinut levitä saappaiden mukana kulkeutuneesta ulosteesta, tai jos eläimiä on siirrelty pöytää pitkin. Ympäristössä olevan yhteisen tartuntalähteen lisäksi tutkijat ovat ehdottaneet, että syynä joidenkin genotyyppien vallitsevuuteen tiloilla voivat olla erot kampylobakteerikantojen kolonisointikyvyssä ja nautojen vastustuskyvyssä (Nielsen, 2002; Hakkinen & Hänninen, 2009; Rapp ym., 2012). Tilalla B vallinnut genotyyppi S11 oli kuuden yleisimmin suomalaisista naudoista eristetyn genotyypin joukossa vuonna 2003 tehdyssä teurastamokartoituksessa (Hakkinen ym., 2007).

Kaikissa tutkituissa eläimissä esiintyi kerralla vain yhtä *SmaI*-tyyppiä edustavaa *C. jejuni* -bakteerikantaa, vaikka naudoissa on raportoitu toisinaan esiintyneen useamman genotyypin tai jopa kahta eri *Campylobacter*-suvun lajia, joista toinen on yleensä ollut *C. hyointestinalis* (Hakkinen ym., 2007; Hakkinen & Hänninen, 2009). *C. jejuni* -kantoja kuitenkin genotyypitettiin korkeintaan kaksi ulostenäytettä kohden, joten on mahdollista, että genotyyppisiä olisi löydetty enemmän, jos tyypitys olisi tehty useammalle bakteerikannalle tai lisäksi *KpnI*-entsyymillä. Toisaalta kahdesti tilalla B tutkitut ja positiivisina säilyneet naudat erittivät samaa genotyyppiä molemmissa näytteenotoissa, mikä viittaa siihen, että ne erittivät vain yhtä *C. jejuni* -kantaa, tai että kyseinen bakteerikanta on ainakin vallitseva suolistossa.

Kahdesta tilan B naudasta ei eristetty kampylobakteereita ensimmäisessä ulostenäytteenotossa, mutta toisessa näytteenotossa toisesta todettiin *C. hyointestinalis* ja toisesta *C. jejuni*. Näillä yksilöillä kampylobakteerien erityis saattaa olla ajoittaista, minkä on raportoitu olevan yleistä naudoilla (Hakkinen & Hänninen, 2009; Humphrey & Becket, 1987; Inglis ym., 2004; Rapp ym., 2012). Vastaavasti ne ovat saattaneet saada tartunnan vasta ensimmäisen näytteenoton jälkeen navetassa, esimerkiksi ruokintapöydältä, jolta eristettiin samaa genotyyppiä edustanut *C. jejuni* kuin toisella naudoista. Vaikka kampylobakteerien esiintyvyyden karjassa on havaittu olevan korkeimmillaan laidunkaudella ja sen jälkeen, myös sisäruokintakauden aikaista kampylobakteerien esiintyvyyden nousua on raportoitu (Humphrey & Becket, 1987; Hänninen ym., 1998; Minihan ym., 2004; Hakkinen & Hänninen, 2009). Tartunnan riskiä sisäruokintakaudella lisää karjan suurempi tiheys navettaoloissa verrattuna

laitumeen (Ellis-Iversen ym., 2009). Lisäksi kampylobakteerit saattavat selvitä paremmin navetassa, joka voi tarjota niille suotuisimmat olot kuin luonnonympäristö. Kampylobakteerien leviämistä navetassa sisäruokintakaudella voidaan ehkäistä huolehtimalla juomakaukaloiden ja ruokintapöydän puhtaudesta (Perkiömäki ym., 2012).

6.4 Maitonäytteiden ja maitosuodattinten vertailu näytematriiseina

Vuoden 2014 alussa Suomessa voimaan tullut raakamaitoasetus (MMM 699/2013) edellyttää säännöllistä, myytyyn maitomäärään perustuvaa raakamaidon hygienian seuranta tiloilta, jotka myyvät raakamaitoa yli 2500 kg vuodessa suoraan kuluttajille tai pakkaavat sitä. Asetusta säädettäessä vaihtoehtoiseksi näytematriisiksi maitonäytteiden rinnalle harkittiin maitosuodattimia, sillä niiden tutkiminen on todettu merkittävästi herkemmäksi menetelmäksi patogeenisten bakteerien osoittamiseen tilatankkimaidosta kuin maitonäytteiden tutkiminen (Leone ym., 2010; Giacometti ym., 2012d; van Kessel ym., 2011). Lupaavat tulokset kampylobakteerien toteamisessa maitosuodattimista on kuitenkin saatu pääosin PCR-menetelmiä hyödyntäen (Leone ym., 2010; Giacometti ym., 2012b), minkä vuoksi kyseisen matriisin soveltuvuutta raakamaitoasetuksessa säädetylle viljelymenetelmälle haluttiin selvittää.

6.4.1 *C. jejuni* -bakteerin toteaminen maitosuodattimista

Tilan B seurannassa maitosuodattimet eivät osoittautuneet maitonäytteitä paremmaksi näytematriisiksi raakamaidon kontaminoitumisen tutkimiseen olettaen, ettei maidon pitkäaikaisen kontaminaation syy ollut ainoastaan putkistossa oleva biofilmi. Joillain näytteenottoкерроilla, joilla *C. jejuni* todettiin maidosta, sitä ei todettu maitosuodattimista. Lisäksi vain yhdessä seitsemästä näytteenotosta *C. jejuni* todettiin kaikista suodattimista, kun niitä tutkittiin useampi kuin yksi samalla näytteenottokerralla.

Maitosuodatinnäytteiden kuivuminen sekä kampylobakteereille epäedulliset happelliset olot kuljetuksen aikana voisivat selittää kampylobakteerien toteamisen vain osasta suodatinnäytteitä. Maitosuodattimilla tehdyssä säilyvyyskokeessa tilan B epidemiakanta kuitenkin osoittautui säilyvän kuljetusoloissa kohtalaisen hyvin; korkein siirrostettu pitoisuus 10^4 pmy / maitosuodatin oli todettavissa vielä 72 tunnin kuluttua siirrostuksesta. Sen sijaan pienintä siirrostettua pitoisuutta 10^2 pmy / maitosuodatin ei

pystytty toteamaan edes heti siirrostuksen jälkeen tutkituista näytteistä, kun mCCDA-maljalla kasvoi runsaasti *Acinetobacter* -suvun bakteeriksi tunnistettua epätyypillisiä taustaflooraa. Taustafloora häiritsi *C. jejuni* -bakteerin toteamista myös korkeimmalla siirroksen pitoisuudella pidempään säilytetyissä näytteissä.

Tilan B maitosuodattimilla tehdyt havainnot olivat samansuuntaisia. Molemmilla kerroilla, kun *C. jejuni* todettiin tilan B maidosta, muttei suodattimista, mCCDA-maljoilla kasvoi runsaasti epätyypillisiä pesäkkeitä, joiden laji jäi kuitenkin tunnistamatta.

Häiritsevän taustakasvun selitys on todennäköisesti tutkimuksessa käytettyjen Bolton ja mCCDA-maljojen yksi selektiivitekijä kefoperatsoni. Se on kolmannen polven kefalosporiini, joka kuuluu β -laktaamien antibioottiryhmään. Useille β -laktaameille resistenttien Extended-Spectrum β -lactamase (ESBL) -bakteerikantojen on raportoitu yleistyneen viime vuosina sekä esiintyvän sekä ihmisissä että naudoissa (Canton ym., 2008; Carattoli, 2008; Poirel ym., 2012). β -laktaami-ryhmän antibiootteja hydrolysoivia, β -laktamaasi-entsyymejä tuottavia ESBL-bakteerikantoja on todettu *Enterobacteriaceae* -heimoon kuuluvilta lajeilta, kuten *E. coli* -bakteereilta, sekä muutamilta muilta gramnegatiivisilta bakteereilta kuten *Acinetobacter* -suvun lajeilta (Bradford, 2001). Belgiassa broilereista on eristetty *E. coli* -bakteerikantoja, jotka ovat resistenttejä nelinkertaiselle määrälle kefoperatsonia kuin mitä Bolton-liemi sisältää (Jasson ym., 2009). *Acinetobacter* on yleinen maaperäbakteeri, jota on eristetty naudan vedinten iholta ja vedinkanavasta (Braem ym., 2012; Gill ym., 2006). *E. coli* taas on osa naudan suoliston normaaliflooraa. Näin ollen molempien ESBL-bakteerikantoja saattaa päätyä ympäristöstä sekä ulosteen mukana raakamaitoon ja maitosuodattimiin.

ESBL-bakteerit kasvavat nopeammin kuin kampylobakteerit, jolloin ne saavat helposti kilpailuedun Bolton-rikastusliemessä ja mCCDA-maljalla. Tällöin kampylobakteereita ei välttämättä pystytä toteamaan näytteistä ja ne saatetaan todeta virheellisesti negatiivisiksi (Habib ym., 2008; Musgrove ym., 2001). Bolton-liemen selektiivitekijöille vastustuskykyisten ESBL-bakteerikantojen lisääntymisestä johtuen ISO 10272-1 -standardin työn alla olevaan, päivitettyyn versioon tulee Bolton-liemen vaihtoehtoksi selektiivisempi Preston-liemi runsaasti taustamikrobistoa sisältäville näytteille, kuten raakamaidolle (ISO 10272-1 luonnos, 2014). Preston-liemen sisältämät antibiootit rifampisiini ja polymyksiini tosin saattavat inhiboida stressaantuneiden *C. jejuni* -solujen kasvua (Baylis ym., 2000; Jasson ym., 2009).

Häiritsevistä taustakasvusta johtuen tämän säilyvyyskokeen tulokset eivät tue esimerkiksi van Kesselin ym. (2011) ja Leonen ym. (2010) tutkimuksissa saatuja tuloksia, joiden mukaan maitosuodattimet ovat parempi näytematriisi verrattuna raakamaitoon viljelymenetelmin tutkittuna. Toisaalta maito- ja maitosuodatinmatriisien välisessä vertailussa on otettava huomioon, että suodatinten läpi virrannut maito ei välttämättä ollut *C. jejuni* -pitoisuudeltaan homogeenista. Kampylobakteereita päätyi maitoon todennäköisesti pulsseina riippumatta siitä, mikä kontaminaation lähde oli. Näin ollen on mahdollista, ettei kaikkien tutkittujen suodatinten läpi virrannut maito sisältänyt kampylobakteereita. Näytteenottoa ei myöskään aikataulullisista syistä johtuen pystytty jokaisella kerralla ajoittamaan siten, että tutkittu maitonäyte olisi virrannut kaikkien tutkittujen maitosuodatinten läpi.

6.4.2 *C. jejuni* -bakteerin säilyvyys raakamaidossa

Raakamaidolla tehdyssä säilyvyyskokeessa ilmeni, että *C. jejuni* -bakteerikantojen kyky säilyä maidossa vaihteli ja säilyvyys oli keskimäärin huono. Kolme viidestä kokeesta mukana olleesta, tilalta B eristetyistä *C. jejuni* -bakteerikannasta ei ollut todettavissa enää 48 tunnin kuluttua siirrosta. *C. jejuni* -bakteerin on useissa muissakin tutkimuksissa todettu säilyvän huonosti raakamaidossa johtuen sen herkkyydestä ympäristötekijöille (Doyle & Roman, 1982; Humphrey & Becket, 1987; Giacometti ym., 2012c).

C. jejuni altistui säilyvyyskokeessa useille eri ympäristön stressitekijöille, jotka todennäköisesti heikensivät sen säilyvyyttä raakamaidossa. Kuten Doyle & Romanin (1982) sekä Giacomettin (2012c) tutkimuksissa, tämäkin säilyvyyskoe tehtiin aerobisissa oloissa, jolloin osasyynä *C. jejuni* -bakteerien pitoisuuden laskuun saattaa olla ilman hapen aiheuttama oksidatiivinen stressi. Muita selittäviä tekijöitä saattavat olla pH:n aleneminen ja mikrobiflooran sekä sen tuottamien antimikrobisten tekijöiden lisääntyminen säilytyksen aikana. Osa mikrobifloorasta on voinut tuottaa vetyperoksidia (H_2O_2), joka aktivoi antimikrobisen laktoperoksidaasisysteemin (Doyle & Roman, 1982; Giacometti ym., 2012c). Laktoperoksidaasin antimikrobisen vaikutuksen on todettu kohdistuvan paitsi eksponentiaalisen kasvun vaiheessa oleviin myös stationääri- ja substationääri- vaiheissa oleviin kampylobakteereihin (Ronacher ym., 2003). Kampylobakteerien onkin raportoitu säilyvän pidempään steriilissä raakamaidossa, jonka

laktoperoksidaasisysteemi on inaktivoitu kuumentamalla, kuin tuoreessa raakamaidossa (Doyle & Roman, 1982).

Kampylobakteerien määrän raakamaidossa on raportoitu vähenevän säilytyksen aikana säilytysoloista riippumatta, mutta ne säilyvät hieman pidempään +4 °C:ssa kuin korkeammissa lämpötiloissa (Doyle & Roman, 1982; Giacometti ym., 2012c). Lämpötilan vaikutus *C. jejuni* -bakteerien säilyvyyteen on tullut ilmi myös pitten ym. (1998) aerobisissa oloissa vesimatriisissa tehdyillä säilyvyyskokeilla, joissa *C. jejuni*-bakteerin säilyvyys heikkeni lineaarisesti säilytyslämpötilan noustessa. Tutkimuksessa *C. jejuni* säilyi vedessä lähes 10-kertaa pidempään +4 °C:ssa kuin +37 °C:ssa säilytettynä. Viileässä niiden elintoiminnot todennäköisesti hidastuvat, jolloin ne saattavat kestää paremmin ympäristön stressitekijöitä.

Raakaamaitoasetuksen mukaan (MMM 699/2013) maitonäytteet on tutkittava kampylobakteerien osalta ISO 10272-1 -viljelymenetelmällä tai vastaavalla validoidulla menetelmällä. Näytteessä olevat kampylobakteerit voidaan kuitenkin todeta viljelymenetelmin ainoastaan silloin, kun solut ovat elossa. Tämän säilyvyyskokeen lisäksi useissa tutkimuksissa ilmenneestä *C. jejuni* -bakteerin huonosta säilyvyydestä (Doyle & Roman, 1982; Humphrey & Becket, 1987; Giacometti ym., 2012c) johtuen raakamaitonäytteet tulisi toimittaa tutkittavaksi 24 tunnin kuluessa näytteenotosta ja näytteiden saavuttua laboratorioon tutkimus olisi syytä aloittaa viipymättä. Pidempi kuljetusaika aiheuttaa riskin todeta näytteet virheellisesti negatiivisiksi.

Tilalla B liian pitkä kuljetusaika heikensi tulosten luotettavuutta kahdessa näytteenotossa. Ensimmäisellä näytteenottokerralla, kun näytteet olivat matkalla 72 tuntia näytteenotosta, maidosta tai maitosuodattimista ei todettu *C. jejuni* -bakteereita. Toisella näytteenottokerralla, kun näytteet olivat matkalla 48 tuntia, sekä maidosta että maitosuodattimista todettiin *C. jejuni*, mutta pitoisuus maidossa oli alhaisempi kuin myöhemmissä näytteenotoissa. Ottaen huomioon, että tilalla oli ollut raakamaitovälitteinen kampylobakteeriepidemia juuri ennen seurantajakson alkua ja kaikista myöhemmistä näytteenotoista todettiin *C. jejuni* -bakteereita suurempina pitoisuuksina, kahdesta ensimmäisestä näytteenotosta saatujen tulosten voidaan olettaa johtuneen näytteiden pitkästä kuljetusajasta. Myös Ruususen ym. (2013) tutkimuksessa, jossa kartoitettiin kampylobakteerien esiintyvyyttä suomalaisten tilojen tankkimaidossa, pitkä kuljetusaika (48 h) saattoi olla syynä siihen, ettei lämpökestoisia kampylobakteereita todettu yhdestäkään 183:sta ympäri maata kerätystä tankkimaitonäytteestä. Muissa eurooppalaisissa samankaltaisissa tutkimuksissa, joissa kuljetusaika on kuitenkin ollut

lyhempi, lämpökestoisten kampylobakteerien esiintyvyys tilatankkimaidossa on ollut 4,6–12,0 % (Wysok ym., 2011; Bianchini ym., 2014). Toisaalta kahdessa Yhdysvalloissa tehdyssä tutkimuksessa *C. jejuni* -bakteerien esiintyvyydeksi tilatankkimaidossa todettiin 2,0 % ja 9,2 %, vaikka näytteenoton ja tutkimuksen aloituksen välillä kulunut aika saattoi olla jopa 36 tuntia (Jayarao & Henning, 2001; Jayarao ym., 2006).

6.5 Johtopäätökset

Kampylobakteerien esiintyminen lypsykarjassa voi vaihdella huomattavasti maitotilojen välillä. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla *C. jejuni* -bakteerin esiintymistä tutkimuksessa mukana olleilla kolmella lypsykarjatilalla, seurata kampylobakteerien esiintymistä epidemiatilojen raakamaidossa sekä selvittää raakamaidon kontaminoitumisen syitä. Vaikka kampylobakteereita todettiin kaikilta kolmelta tutkimuksessa mukana olleelta tilalta, niiden esiintyminen naudoissa oli kuitenkin selvästi alhaisempi kontrollitilalla A verrattuna epidemiatiloihin B ja C, joiden naudoista arviolta yli puolet eritti kampylobakteereita ulosteeseen. Molemmilla epidemiatiloilla kontaminaatio oli todennäköisesti alkujaan ulosteperäinen, sillä epidemiakantaa vastaava *C. jejuni* -genotyyppi oli vallitsevana tilojen naudoissa. Vaikka *C. jejuni* -bakteerin korkean esiintyvyyden naudoissa on todettu olevan yhteydessä raakamaidon saastumiseen kampylobakteereilla, toistaiseksi ei ole kuitenkaan tutkittu, miten paljon kampylobakteerien esiintyvyys naudoissa lisää maidon kontaminoitumisen riskiä (Bianchini ym., 2014).

Tilalla C raakamaidon lyhytaikainen kontaminaatio oli luultavasti seurausta hetkellisestä huonosta lypsyhygieniasta, sillä kampylobakteereita ei todettu maidosta tai maitosuodattimista enää seurantajaksolla. Epidemian jälkeen hygieniakäytäntöjä tilalla parannettiin. Raakamaidon ajoittaista saastumista vähäisillä ulostemäärillä voi kuitenkin olla mahdotonta täysin estää – etenkin, kun tilalla on käytössä automaattilypsy, jonka on todettu lisäävän useiden hygieniaindikaattorimikrobien määrää raakamaidossa (Klungel ym., 2000; Rasmussen ym., 2002; de Koning ym., 2003; Salovuori ym., 2005; Meriluoto, 2009).

Tilalla B raakamaidon pitkäaikaisen kontaminaation taustalla taas oli pitkäkestoinen saastutus, jonka aiheuttajaa ei kuitenkaan saatu selville, eikä kontaminaatio poistunut viimeiseen näytteenottoon mennessä puoli vuotta epidemian jälkeen. Kontaminaation

aiheuttajaksi epäiltyä mahdollista biofilmiä ei pystytty lypsylaitteistosta todentamaan, mutta epidemiakanta osoittautui raakamaidolla tehdyssä säilyvyyskokeessa kestävämmäksi kuin neljä muuta tilalla esiintyvää *C. jejuni* -kanta. Epidemiakannan säilyvyyteen vaikuttavia ominaisuuksia voitaisiin kuitenkin edelleen laboratorio-oloissa selvittää erilaisin biofilmin muodostus- ja säilyvyyskokein.

Utaretulehduksen mahdollisuutta tilalla B ei selvitetty, mutta viime vuosina Italiassa raportoitujen tapausten perusteella on syytä epäillä, että se saattaa olla luultua yleisempi raakamaidon kampylobakteerikontaminaatioiden aiheuttaja – etenkin, jos maidosta toistuvasti eristetään samaa genotyyppiä edustava *C. jejuni* -bakteerikanta (Luini ym., 2009; Bianchini ym., 2014). Koska suuren karjan yksittäisten maitonäytteiden tutkiminen on työlästä ja aikaa vievää, Luinin ym. (2009) ja Bianchinin ym. (2014) kuvaama tutkimusprotokolla soveltuisi hyvin vastaavien tapausten selvittämiseen kuin tilalla B. Tutkijat rajasivat ensin yhteismaitonäytteitä tutkimalla, missä osassa karjaa tartunta on. Positiiviseksi todetusta osasta tutkittiin maitonäytteet naudoista yksitellen ja lopulta *C. jejuni* -bakteereita maitoon erittävän yksilön utarelohkot tutkittiin vielä erikseen. Koska *C. jejuni* -bakteerin pitoisuus maidossa saattaa olla pieni, hyvä ratkaisu voisi olla tutkia yhteismaitonäytteet PCR-menetelmin ja vasta yksittäiset maitonäytteet viljelymenetelmin.

Yhtenä tämän tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla maitosuodattimia ja maitoa näytematriiseina. Vastoin esimerkiksi van Kesselin ym. (2011) ja Leonen ym. (2010) tutkimustuloksia, tässä tutkimuksessa saatujen kokemusten perusteella maito vaikuttaisi maitosuodattimia paremmalta näytematriisilta, kun tankkimaidon kontaminoitumista tutkitaan viljelymenetelmin. Maitonäytteitä tutkittaessa on kuitenkin huomioitava tässäkin tutkimuksessa osoitettu kampylobakteerien huono säilyvyys raakamaidossa, minkä vuoksi näytteet olisi syytä tutkia 24 tunnin kuluessa näytteenotosta tulosten luotettavuuden takaamiseksi. Virheellisten negatiivisten tulosten välttämiseksi kampylobakteerien osalta maitonäytteille olisikin syytä asettaa enimmäiskuljetusaika, jota pidempään matkalla olleiden näytteiden negatiiviset tulokset hylättäisiin ja näytteenotto uusittaisiin.

Maitosuodatinten säilyvyyskokeessa suodattimissa yleisesti esiintynyt taustafloora osoittautui suuremmaksi ongelmaksi kuin kampylobakteereille epäsuotuisat kuljetusolot. Syynä oli kuitenkin ennen kaikkea tässä tutkimuksessa käytetty Bolton-rikastusliemi. Näytematriisien välinen vertailu kannattaisikin toistaa ISO 10272-1 -menetelmäluonnoksessa enemmän taustaflooraa sisältäville alkutuotannon näytteille

suositellulla Preston-rikastusliemellä, joka useampia antibiootteja sisältävänä on Bolton-lientä selektiivisempi.

Voimassa olevan raakamaitoasetuksen (MMM 699/2013) ja Eviran suosituksen (Eviran ohje 16040/1, 2014) mukaisesti raakamaitoa suoraan kuluttajille myyvien tilojen tankkimaidon näytteenottotiheys määräytyy myydyn maitomäärän mukaan. Korkeintaan 5000 kg myyviltä tiloilta maitonäytteet tutkitaan vain kerran vuodessa (Eviran ohje 16040/1, 2014). Tutkimustulos kuitenkin kuvaa tilannetta ainoastaan näytteenottohetkellä, eikä takaa raakamaidon turvallisuutta näytteenottojen välisenä aikana. Jatkovampaa tietoa tilan yleisestä hygieniatasosta sekä lypsyhygieniasta antavat kuukausittain tankkimaidosta tutkittavat kokonaisbakteerimäärät, jotka eivät kuitenkaan korreloi kampylobakteerien esiintymisen raakamaidossa kanssa (Humphrey & Becket, 1987). Tutkimuksissa onkin havaittu, että myös korkean hygieniatason tilojen raakamaidossa saattaa esiintyä patogeenisiä bakteereita (Ruusunen ym., 2013).

Kuluttajien tietoisuutta raakamaidon mahdollisesti sisältämistä patogeeneista ei ole Suomessa tutkittu. Raakamaitoasetuksen (699/2013) myötä raakamaidon myyjät ovat kuitenkin velvollisia antamaan ostotapahtuman yhteydessä ohjeistusta raakamaidon turvallisesta säilytyksestä ja käsittelystä. Kampylobakteerin kohdalla tosin edes lyhyestä säilytysajasta ja kylmäketjun katkeamattomuudesta ei ole apua, sillä kampylobakteerit eivät lisäännä maidossa ja niiden säilyvyys maidossa on jopa parempi +4 °C:ssa kuin yli +10 °C:ssa (Doyle & Roman ym., 1982; Park, 2002; Giacometti ym., 2012c). Ainoa keino varmistaa raakamaidon turvallisuus onkin kuumentaa se (Giacometti ym., 2012c; Giacometti ym., 2012d).

Kiitokset

Tahdon lämpimästi kiittää ohjaajiani erikoistutkija Marjaana Hakkista perusteellisesta ja kannustavasta ohjauksesta koko prosessin ajan sekä professori Per Sarista asiantuntevista kommentteista. Haluan kiittää myös tutkimuksessa mukana olleita tiloja ja yhteistyötahoja aina maakuntia myöten sekä tutkimuksen rahoittanutta Walter Ehrnström -säätiötä. Kiitän lämpimästi erikoistutkija Jukka Rantaa avusta tulosten tilastollisessa analysoinnissa. Suuret kiitokset ansaitsevat myös työtoverini Eviran elintarvikemikrobiologiajaostossa campylobakteerien analytiikkaan perehdyttämisestä sekä avusta käytännön pulmissa työn kokeellisen osuuden aikana. Tahdon myös kiittää vanhempiani kannustuksesta sekä avusta tekstini kielenhuollon kanssa. Lopuksi haluan esittää erityiset kiitokset rakkaalle avopuolisolleni Leo Aarniolle, joka väsymättä jaksoi tukea ja auttaa minua läpi kirjoitusprosessin.

Lähteet

- Studahl A & Andersson Y (2000). Risk factors for indigenous campylobacter infection: a Swedish case-control study. *Epidemiology & Infection*, 125: 269–275.
- Bacon D J, Alm R A, Burr D H, Hu L, Kopecko D J, Ewing C P, Trust T J & Guerry P (2000). Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and Immunity*, 68: 4384-4390.
- Barkema H W, Schukken Y H & Zadoks R N (2006). *Invited Review*: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89: 1877–1895.
- Baylis C L, MacPhee S, Martin K W, Humphrey T J & Betts R P (2000). Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 884–891.
- Bessel P R, Rotariu O, Innocent G T, Smith-Palmer A, Strachan N J C, Forbes K J, Cowden J M, Reid S W J & Matthews L (2012). Using sequence data to identify alternative routes and risk of infection: a case-study of campylobacter in Scotland. *BMC Infectious Diseases*, 12: 80.
- Bianchini V, Borella L, Benedetti V, Parisi A, Miccolupo A, Santoro E, Recordati C & Luini M (2014). Prevalence in bulk tank milk and epidemiology of *Campylobacter jejuni* in dairy herds in Northern Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 1832–1837.
- Black R D, Levine M M, Clements L M, Hughes T P & Blaser M J (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *The Journal of Infectious Diseases*, 157: 472–479.

- Blaser M J, Hardesty H L, Powers B & Wang W L (1980). Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *Journal of Clinical Microbiology*, 11: 309–313.
- de Boer P, Wagenaar J A, Achterberg R P, van Putten J P M, Schouls L M & Duim B (2002). Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity *in vivo*. *Molecular Microbiology*, 44: 351–359.
- Bradford P A (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 933–951.
- Braem G, de Vlieghe S, Verbist B, Heyndrickx M, Leroy F & de Vuyst L (2012). Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Veterinary Microbiology*, 157: 383–390.
- Burr D H, Rollins D, Lee L H, Pattarini D L, Walz S S, Tian J-H, Pace J L, Bourgeois A L & Walker L I (2005). Prevention of disease in ferrets fed an inactivated whole cell *Campylobacter jejuni* vaccine. *Vaccine*, 23: 4315–4321.
- Buswell C M, Herlihy Y M, Lawrence L M, McGuigan T M, Marsh P D, Keevil C W & Leach S A (1998). Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 733–741.
- Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F & Coque T M (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 144–153.
- Carattoli A (2008). Animal reservoirs of extended-spectrum β -lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 117–123.
- Cawthraw S A, Lind L, Kaijser B & Newell D G (2000). Antibodies, directed towards *Campylobacter jejuni* antigens, in sera from poultry abattoir workers. *Clinical Experimental Immunology*, 122: 55–60.
- Cawthraw S A, Feldman R A, Sayers A R & Newell D G (2002). Long-term antibody responses following human infection with *Campylobacter jejuni*. *Clinical Experimental Immunology*, 130: 101–106.
- Chen H C & Stern N J (2001). A competitive exclusion of heterologous *Campylobacter* spp. in chicks. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 848–851.
- Chynoweth R W, Hudson J A & Thom K (1998). Aerobic growth and survival of *Campylobacter jejuni* in food and stream water. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 341–344.
- Claeys W L, Cardoen S, Daube G, Block J D, Dewettinck K, Dierick K, De Zutter L, Huyghebaert A, Imberechts H, Thiange P, Vandenplas Y & Herman L (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 31: 251–262.
- Coker A O, Isokpehi R D, Thomas B N, Amisu K O & Obi S L (2002). Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 237–243.
- Cools I, Uyttendaele M, Caro C, D’Haese E, Nelis H J & Debevere J (2003). Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *Journal of Applied Microbiology* 94: 886–892.

- Cornelius A J, Gilpin B, Carter P, Nicol C & On S L W (2010). Comparison of PCR binary typing (P-BIT), a new approach to epidemiological subtyping of *Campylobacter jejuni*, with serotyping, pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 1533–1544.
- Costerton J W, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D & James G (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176: 2137–2142.
- Dasti J I, Tareen A M, Lugert R, Zautner A E & Groß U (2010). *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300: 205–211.
- Debruyne L, Gevers D & Vandamme P (2008). Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. Teoksessa: Blaser M J, Nachamkin I & Szymanski C M (toim.). *Campylobacter*. ASM Press, Washington DC, s. 3–25.
- Dingle K E, Colles F M, Wareing D R A, Ure R, Fox A J, Bolton F E, Bootsma H J, Willems R J L, Urwin L & Maiden M C J (2001). Multi locus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 14–23.
- Domíniguez C, Gómez I & Zumalacárregui J (2002). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 72: 165–168.
- Doyle M P & Roman D J (1982). Prevalence and survival of *Campylobacter jejuni* in unpasteurized milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 1154–1158.
- Dunson D B (2001). Commentary: Practical advantages of bayesian analysis of epidemiologic data. *American Journal of Epidemiology*, 153: 1222–1226.
- ECDC (2013). Annual epidemiological report: Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. European Centre for Disease Prevention and Control. Saatavissa: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/AnnualEpidemiological-Report-2012.pdf>.
- EFSA (2005). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to *Campylobacter* in animals and foodstuffs. *The EFSA Journal*, 173: 1–10.
- EFSA (2009). Scientific report of EFSA: Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. *EFSA Journal* 2010, 8: 1503.
- EFSA (2013). EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2011. *EFSA Journal* 2013, 11: 3129. Saatavissa: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsa-journal/doc/3129.pdf>.
- Elizaquível P, Aznar R & Sánchez G (2013). Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *Journal of Applied Microbiology*, 116: 1–13.
- Ellis-Iversen J, Pritchard G C, Wooldridge M & Nielen M (2009). Risk factors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in young cattle on English and Welsh farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 88: 42–48.
- Elmoslemany A M, Keefe G P, Dohoo I R, Wichtel J J, Stryhn H & Dingwell R T (2010). The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive Veterinary Medicine*, 95: 32–40.

Epidemianselvitysraportti A, 2013. Ei julkisesti saatavissa.

Epidemianselvitysraportti B, 2013. Ei julkisesti saatavissa.

Ethelberg S, Simonsen J, Gerner-Smidt P, Olsen K E P & Mølbak K (2005). Spatial distribution and registry-based case-control analysis of *Campylobacter* infections in Denmark, 1991-2001. *American Journal of Epidemiology*, 162: 1008–1015.

Evans M R, Roberts R J, Ribeiro C D, Gardner D & Kembrey D (1996). A milk-borne *Campylobacter* outbreak following an educational farm visit. *Epidemiology & Infection*, 117: 457–462.

Eviran ohje 16040/1 (2014). Raakamaidon ja ternimaidon myynti ja valvonta. Evira. Saatavissa: http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/laitokset/raakamaito_eviran_ohje_16040_1_fi.pdf. Viitattu 10.3.2014.

EY/178/2002. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus elintarvikelainsäädäntöä koskevista yleisistä periaatteista ja vaatimuksista, Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen perustamisesta sekä elintarvikkeiden turvallisuuteen liittyvistä menettelyistä. Viitattu 15.3.2014. Saatavissa: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:031:0001:0024:FI:PDF>.

EY/853/2004. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus eläinperäisiä elintarvikkeita koskevista erityisistä hygieniasäännöistä. Viitattu 15.3.2014. Saatavissa: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0022:0082:FI:PDF>.

Farnaud S & Evans R W (2003). Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40: 395–405.

Fitzgerald C, Helsel L O, Nicholson M A, Olsen S J, Swerdlow D L, Flahart R, Sexton J & Fields P I (2001). Evaluation of Methods for Subtyping *Campylobacter jejuni* during an Outbreak Involving a Food Handler. *Journal of Clinical Microbiology*, 39:2386–2390.

Forbes K J, Gormley F J, Dallas J F, Labovitiadi O, MacRae M, Owen R J, Richardson J, Strachan N J C, Cowden J M, Ogden I D & McGuigan C C (2009). *Campylobacter* immunity and coinfection following a large outbreak in a farming community. *Journal of Clinical Microbiology*, 47:111–116.

French N, Barrigas M, Brown P, Ribiero P, Williams N, Leatherbarrow H, Birtles R, Bolton E, Fearnhead P & Fox A (2005). Spatial epidemiology and natural population structure of *Campylobacter jejuni* colonizing a farmland ecosystem. *Environmental Microbiology*, 7: 1116–1126.

Gelman A, Carlin J B, Stern H S, Dunson D B, Vehtari A & Rubin D B (2013). Bayesian data analysis, 3. painos. CRC Press, 2013.

Giacoboni G I, Itoh K, Hirayama K, Takahashi E & Mitsuoka T (1993). Comparison of faecal *Campylobacter* in calves and cattle of different ages and areas in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55: 555–559.

Giacometti F, Serraino A, Finazzi G, Daminelli P, Losio M N, Arrigoni N, Piva S, Florio D, Riu F & Zanoni R G (2012a). Sale of raw milk in Northern Italy: Food safety implications and comparison of different analytical methodologies for detection of foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9: 293–297.

Giacometti F, Serraino A, Finazzi G, Daminelli P, Losio M N, Bonilauri P, Arrigoni N, Garigliani A, Mattioli R, Alonso S, Piva S, Florio D, Riu F & Zanoni R G (2012b). Foodborne pathogens in in-line milk filters and associated on-farm risk factors in dairy

- farms authorized to produce and sell raw milk in Northern Italy. *Journal of Food Protection*, 75: 1263–1269.
- Giacometti F, Serraino A, Finazzi G, Daminelli P, Losio M N, Tamba M, Garigliani A, Mattioli R, Riu R & Zanoni R G (2012c). Field handling conditions of raw milk sold in vending machines: experimental evaluation of the behavior of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Campylobacter jejuni*. *Italian Journal of Animal Science*, 11: 132–136.
- Giacometti F, Serraino A, Bonilauri P, Ostanello F, Daminelli P, Finazzi G, Losio M N, Marchetti G, Liuzzo G, Zanoni R G & Rosmini R (2012d). Quantitative risk assessment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and *Campylobacter jejuni* related to consumption of raw milk in a province in Northern Italy. *Journal of Food Production*, 75: 2031–2038.
- Gill J J, Sabour P M, Gong J, Yu H, Leslie K E & Griffiths M W (2006). Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of the lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 56: 471–481.
- Gillespie I A, O'Brien S J, Adak G K, Tam C C, Frost J A, Bolton F J & Tompkins D S (2003). Point source outbreaks of *Campylobacter jejuni* infection – are they more common than we think and what might cause them? *Epidemiology & Infection*, 130: 367–375.
- Gilpin B, Cornelius A, Robson B, Boxall N, Ferguson A, Nicol C & Henderson T (2006). Application of pulsed-field gel electrophoresis to identify potential outbreaks of campylobacteriosis in New Zealand. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 406–412.
- Grove-White D H, Leatherbarrow A J H, Cripps P J, Diggle P J & French N P (2010). Temporal and farm-management-associated variation in the faecal-pat prevalence of *Campylobacter jejuni* in ruminants. *Epidemiology & Infection*, 138: 549–558.
- Habib I, Sampers I, Uyttendaele M, Berkvens D & De Zutter L (2008). Baseline data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 5483–5489.
- Habib I, De Zutter L & Uyttendaele M (2013). *Campylobacter* species. Teoksessa Doyle M P & Buchanan R L (Toim.). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4. painos. ASM Press, Washington D.C., 2013. s. 263–286.
- Hakkinen M, Heiska H & Hänninen M-L (2007). Prevalence of *Campylobacter* spp. in cattle in Finland and antimicrobial susceptibilities of bovine *Campylobacter jejuni* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3232–3238.
- Hakkinen M & Hänninen M-L (2009). Shedding of *Campylobacter* spp. in Finnish cattle on dairy farms. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 898–905.
- Hakkinen M, Nakari U-M & Siitonen A (2009). Chickens and cattle as sources of sporadic domestically acquired *Campylobacter jejuni* infections in Finland. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 5244–5249.
- Hanning I & Slavik M (2009). *Campylobacter jejuni* as a primary colonizing biofilm former. *International Journal of Poultry Science*, 8: 1–6.
- Hansson I, Mars-Åhgren M, Sahlander P, Smedjegård J & Olsson Engvall E (2013). Outbreak of campylobacteriosis in Sweden associated with consumption of raw milk. 16th International Workshop 28th of August – 1st of September 2011. Vancouver, BC, Canada.

- Harrington P, Archer J, Davis J P, Croft D R & Varma J K (2002). Outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with drinking unpasteurized milk produced through a cow-leasing program – Wisconsin, 2001. *Morbidity & Mortality Weekly Report*, 51: 548–549.
- Hatakka M & Halonen H (2000). Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 1999. *Elintarvikeviraston julkaisuja*, 7/2000, Helsinki 2000.
- Hatakka M, Loukaskorpi M & Pakkala P (2001). Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2000. *Eviran julkaisuja*, 11/2001, Helsinki 2001.
- Hatakka M, Johansson T, Kuusi M, Loukaskorpi M, Maijala R & Nuorti P (2002). Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2001. *Elintarvikeviraston julkaisuja*, 7/2002, Helsinki 2002.
- Hatakka M, Johansson T, Kuusi M, Maijala R, Pakkala P & Siitonen A (2003). Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2002. *Elintarvikeviraston julkaisuja*, 7/2003, Helsinki 2003.
- Hatakka M, Johansson T, Kuusi M, Maijala R, Pakkala P & Siitonen A (2004). Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2003. *Elintarvikeviraston julkaisuja*, 8/2004, Helsinki 2004.
- Hauri A M, Just M, McFarland S, Schweigman A, Schlez K & Krahn J (2013). *Campylobacteriosis* outbreaks in the state of Hesse, Germany, 2005-2011: raw milk yet again. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 138: 357–361. Tiivistelmä, PubMed.
- Havelaar A H, van Pelt W, Ang C W, Wagenaar J A, van Putten J P.M., Gross U & Newell D G (2009). Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology. *Critical Reviews in Microbiology*, 35: 1–22.
- Havelaar A H, Ivarsson S, Löfdahl M & Nauta M J (2013). Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in European Union, 2009. *Epidemiology & Infection*, 141: 293–302.
- Hazeleger W C, Wouters J A, Rombouts F M & Abee T (1998). Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3917–3922.
- Heuvelink A E, van Heerwaarden C, Zwartkruis-Nahuis A, Tilburg J J H C, Bos M H, Heilmann F G C, Hofhuis A, Hoekstra T & de Boer E (2009). Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 134: 70–74.
- Hiett K L, Stern N J, Fedorka-Cray P, Cox N A & Seal B S (2007). Molecular phylogeny of the *flaA* short variable region among *Campylobacter jejuni* isolates collected during an annual evaluation of poultry flocks in the Southeastern United States. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4: 339–347.
- Hulkko T, Kuusi M, Lyytikäinen O, Seppälä S & Ruutu P, 2010. Tartuntataudit Suomessa 1995–2009. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos, raportti 17/2010.
- Humphrey T J & Becket P (1987). *Campylobacter jejuni* in dairy cows and raw milk. *Epidemiology & Infection*, 98: 263–269.
- Humphrey T, Mason M & Martin K (1995). The isolation of *Campylobacter jejuni* from contaminated surfaces and its survival in diluents. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 295–303.

- Humphrey T, O'Brien S & Madsen M (2007). *Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective*. International Journal of Food Microbiology, 117: 237–257.
- Hutchinson D N, Bolton F J, Hinchliffe P M, Dawkins H C, Horsley S D, Jessop E G, Robertshaw P A & Counter D E (1985). Evidence of udder excretion of *Campylobacter jejuni* as the cause of milk-borne campylobacter outbreak. Epidemiology & Infection, 94: 205–215.
- Hänninen M-L, Niskanen M & Korhonen L (1998). Water as a reservoir for *Campylobacter jejuni* infection in cows studied by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Journal of -Veterinary Medicine Series B, 45: 37–42.
- Hörman A, Rimhanen-Finne R, Maunula L, von Bonsdorff C-H, Torvela N, Heikinheimo A & Hänninen M-L (2004). *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and indicator organisms in surface water in Southwestern Finland, 2000-2001. Applied and Environmental Microbiology, 70: 87–95.
- Inglis G D, Kalischuk L D & Busz H W (2004). Chronic shedding of *Campylobacter* species in beef cattle. Journal of Applied Microbiology, 97: 410–420.
- ISO 10272-1 luonnos (2014). Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. International Organization for Standardization.
- Jaakola S, Lyytikäinen O, Rimhanen-Finne R, Salmenlinna S, Vuopio J, Roivainen M, Nohynek H, Löflund J-E, Kuusi M & Ruutu P (Toim.) (2013). Tartuntataudit Suomessa 2012. Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos, Tartuntatautiseurannan ja -torjunnan osasto, Helsinki. Raportti 10/2013.
- Jasson V, Uyttendaele M, Rajkovic A & Debevere J (2009). Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 to serve method performance testing. International Journal of Food Microbiology, 118: 241–249.
- Jayarao B M & Henning D R (2001). Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. Journal of Dairy Science, 84: 2157–2162.
- Jayarao B M, Pillai S R, Sawant A A, Wolfgang D R & Hedge N V (2004). Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. Journal of Dairy Science, 87: 3561–3573.
- Jayarao B M, Donaldson S C, Straley B A, Sawant A A, Hedge N V & Brown J L (2006). A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. Journal of Dairy Science, 89: 2451–2458.
- Joergensen K (1981). The microflora of the udder Interior and surface. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, 33: 289–298.
- Jones P H, Willis A T, Robinson D A, Skirrow M B & Josephs D S (1981). *Campylobacter enteritis* associated with the consumption of free school milk. Journal of Hygiene, 87: 155–162.
- Josefsen M H, Löfström C, Hansen T B, Christensen L S, Olsen J E & Hoorfar J (2010). Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. Applied and Environmental Microbiology, 76: 5097–5104.
- Joshua G W P, Guthrie-Irons C, Karlyshev A V & Wren B W (2006). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. Microbiology, 152: 387–396.

- Kálmán M, Szöllősi E, Czermann B, Zimányi M, Szekeres S & Kálmán M (2000). Milkborne *Campylobacter* infection in Hungary. *Journal of Food Protection*, 63: 1426–1429.
- Kalmokoff M, Lanthier P, Tremblay T-L, Foss M, Lau P C, Sanders G, Austin J, Kelly J & Szumanski C M (2006). Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 188: 4312–4320.
- Kapperud G, Espeland G, Wahl E, Walde A, Herikstad H, Gustavsen S, Tveit I, Natås O, Bevanger L, Digranes A (2003). Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: A prospective case-control study in Norway. *American Journal of Epidemiology*, 158: 234–242.
- Kemp R, Leatherbarrow A J H, Williams N J, Hart C A, Clough H E, Turner J, Wright E J & French N P (2005). Prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in environmental water samples from a 100-square-kilometer predominantly dairy farming area. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1876–1882.
- van Kessel J A S, Karns J S, Lombard J E & Koprak C A (2011). Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from U.S. dairies. *Journal of Food Protection*, 74: 759–768.
- Klungel G H, Slaghuis B A & Hogeveen H (2000). The effect of the introduction of automatic milking systems on milk quality. *Journal of Dairy Science*, 83:1998–2003.
- Koehler K, Tamar L, Fein S B, DeLong S M, Hawkins M A, Rabatsky-Ehr T, Ray S M, Shiferaw B, Swanson E & Vugia J D (2006). Population-based incidence of infection with selected bacterial enteric pathogens in children younger than five years of age, 1996–1998. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 25: 129–134.
- Kokotovic B & On S L W (1999). High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiology Letters*, 173: 77–84.
- de Koning K, Slaghuis B & van der Vorst Y (2003). Robotic milking and milk quality: effects of bacterial counts, somatic cell counts, freezing point and free fatty acids. *Italian Journal of Animal Science*, 2: 291–295.
- Ksontini H, Kachouri F & Hamdi M (2013). Dairy biofilm: Impact of microbial community on raw milk quality. *Journal of Food Quality*, 36: 282–290.
- Kuang Y, Tani K, Synnott A J, Ohshima K, Higuchi H, Nagahata H & Tanji Y (2009). Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method. *Biochemical Engineering Journal*, 45: 76–81.
- Kwan P S L, Birtles A, Bolton F J, French N P, Robinson S E, Newbold L S, Upton M & Fox A J (2008a). Longitudinal study of the molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in cattle on dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3626–3633.
- Kwan P S L, Barrigas M, Bolton F J, French N P, Gowland P, Kemp R, Leatherbarrow H, Upton M & Fox A J (2008b). Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* populations in dairy cattle, wildlife, and the environment in a farmland area. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 5130–5138.
- Kärenlampi R, Rautelin H & Hänninen M-L (2003). Temporal and geographical distribution and overlap of penner heat-stable serotypes and pulsed-field gel electrophoresis genotypes

- of *Campylobacter jejuni* isolates collected from humans and chickens in Finland during a seasonal peak. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4870–4872.
- Kärenlampi R, Rautelin H & Hänninen M-L (2007a). Evaluation of genetic markers and molecular typing methods for prediction of sources of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1683–1685.
- Kärenlampi R, Rautelin H, Schönberg-Norio D, Paulin L & Hänninen M-L (2007b). Longitudinal study of Finnish *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates from humans using multilocus sequence typing including comparison with epidemiological data and isolates from poultry and cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 148–155.
- Lander K P & Gill K P W (1980). Experimental infection of the bovine udder with *Campylobacter jejuni/coli*. *The Journal of Hygiene*, 84: 421–428.
- Leone P, Cremonesi P & Stella A (2010). Molecular-based identification of pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp. and *Streptococcus agalactiae*) in raw milk and milk filter residuals. *Rencontre Recherche Ruminants*, 17: 18.
- Lihatiedotus (2013). Broilerin kulutus kasvoi ennätyslukemiin vuonna 2012. Verkkoviite, julkaistu 5.3.2013. Saatavissa: http://www.lihatiedotus.fi/www/fi/media/tiedotteet/2013.php?we_objectID=137. Viitattu 29.3.2014.
- Lindmark H, Harbom B, Thebo L, Andersson L, Hedin G, Osterman B, Lindberg T, Andersson Y, Westöö A & Olsson Engvall E (2004). Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from meats, water and humans in Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 700–706.
- Longenberger A H, Palumbo A J, Chu A K, Moll M E, Weltman A & Ostroff S M (2013). *Campylobacter jejuni* infections associated with unpasteurized milk – multiple states 2012. *Clinical Infectious Diseases*, 57: 263–266.
- LPSN (2014). List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Saatavissa: www.bacterio.net. Viitattu 30.3.2014.
- Luini M, Benedetti V, Piccinini R & Vezzoli F (2009). Casi di infezione mammaria da *Campylobacter jejuni* nel bovino. *Large Animal Review*, 15: 51–54.
- Luis V R, Gillespie I A, O'Brien S J, Russek-Cohen E, Pearson A D & Colwell R R (2005). Temperature-driven *Campylobacter* seasonality in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 85–92.
- Magnússon S H, Guðmundsdóttir S, Reynisson E, Rúnarsson A R, Harðardóttir H, Gunnarson E, Georgsson F, Reiersen J & Marteinsson V T (2011). Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates from human, food, veterinary and environmental sources in Iceland using PFGE, MLST and fla-SVR sequencing. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 971–981.
- Maitohygienialiitto (2013). Laatuhinnoitteluluokitus Suomessa. Saatavissa: <http://www.maitohygienialiitto.fi/tilastot/laatuhinnoitteluluokitus/36-maidon-jakaantuminen-luokkiin>. Viitattu 15.12.2013.
- Maitohygienialiitto (2014). Bakterimäärä maidossa 2012. Saatavissa: <http://www.maitohygienialiitto.fi/tilastot/bakterimaaerae-maidossa/27-maitonaeytteiden-jakaantuminen-luokkiin-bakteerilukujen-mukaan>. Viitattu 4.1.2014.
- Mallet A, Guéguen M, Kauffmann F, Chesneau C, Sesboué A & Desmasures N (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal*, 27: 13–21.

- Meinersmann R J, Helsel L O, Fields P I & Hiatt K L (1997). Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2810–2814.
- Merchant-Patel S, Blackall P J, Templeton J, Price E P, Tong S Y C, Huygens F & Giffard P M (2010). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 493–496.
- Meriluoto M (2009). Lypsytekniikan ja vuodenajan vaikutus raakamaidon mikrobiologiseen laatuun. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Insinööritö 6.5.2009.
- Michaud S, Menard S, Gaudreau C & Arbeit R D (2001). Comparison of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Kpn*I: a population-based study. *Journal of Medical Microbiology*, 50: 1075–1081.
- Minihan D, Whyte P, O'Mahony M, Fanning S, McGill K & Collins J D (2004). *Campylobacter* spp. in Irish feedlot cattle: A longitudinal study involving pre-harvest and harvest phases of the food chain. *Journal of Veterinary Medicine B*, 51: 28–33.
- MMMa 432/2011. Maa- ja metsätalousministeriön asetus salmonellatartunnan vastustamisesta naudoissa ja sioissa. Viitattu 15.3.2014. Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2011/20110432>.
- MMMa 1368/2011. Maa- ja metsätalousministeriön asetus elintarvikkeiden alkutuotannon elintarvikehygieniasta. Viitattu 15.3.2014. Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2011/20111368>.
- MMMa 1369/2011. Maa- ja metsätalousministeriön asetus laitosten elintarvikehygieniasta. Viitattu 15.3.2014. Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2011/20111369>.
- MMMa 699/2013. Maa- ja metsätalousministeriön asetus raakamaidon tuotannon ja luovutuksen elintarvikehygieniasta. Viitattu 15.3.2014. Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2013/20130699>.
- Murphy C, Carroll C & Jordan K N (2003a). Identification of a novel stress resistance mechanism in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 704–708.
- Murphy C, Carroll C & Jordan K N (2003b). Induction of an adaptive tolerance response in the foodborne pathogen, *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiology Letters* 223: 89–93.
- Musgrove M T, Berrang M E, Byrd J A, Stern N J & Cox N A (2001). Detection of *Campylobacter* spp. in ceca and crops with and without enrichment. *Poultry Science*, 80: 825–828.
- Nachamkin I, Bohachick K & Patton C M (1993). Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1531–1536.
- Naidu A S (2000). Lactoperoxidase. Teoksessa *Natural Food Antimicrobial Systems* (Toim. Naidu A S). CRC Press, 2000.
- Nakari U-M, Huovinen E, Kuusi M & Siitonen A (2010). Population-based surveillance study of *Campylobacter* infections in Finland. *Epidemiology & Infection*, 138: 1712–1718.
- Neimann J, Engberg J, Mølback K & Wegener H C (2003). A case-control study of risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in Denmark. *Epidemiology & Infection*, 130: 353–366.

- Nereus W G IV & Chin-Yi C (2009). The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. *Food Microbiology*, 26: 44–51.
- Nesbakken T, Eckner K, Høidal H K & Røtterud O-J (2003). Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering and dressing procedures. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 231–240.
- Nguyen H T T, Corry J E L & Miles C A (2006). Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic *Campylobacters*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 908–913.
- Nielsen E M, Engberg J, Fussing V, Petersen L, Brogren C H & On S L (2000). Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from human, poultry and cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 3800–3810.
- Nielsen E M (2002). Occurrence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle of different age groups in dairy herds. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 85–89.
- Nikolaev Y A & Plakunov V K (2007). Biofilm –”city of microbes” or an analogue of multicellular organisms. *Microbiology*, 76: 125–138.
- Niskanen T, Kuusi M, Johansson T, Siitonen A & Tuominen P (2005). Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2004. Elitarvikeviraston julkaisu, 9/2005, Helsinki 2005.
- Niskanen T, Johansson T, Kuusi M, Raahenmaa M, Siitonen A & Tuominen P (2006). Ruokamyrkytykset Suomessa 2005. Eviran julkaisu, 2/2006, Helsinki 2006.
- Niskanen T, Johansson T, Siitonen A & Kuusi M (2007). Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2006. Eviran julkaisu, 21/2007, Helsinki 2007.
- Niskanen T, Korhonen T, Siitonen A, Johansson T & Miettinen I (2010a). Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2007. Eviran julkaisu, 13/2010.
- Niskanen T, Korhonen T, Siitonen A, Johansson T & Miettinen I (2010b). Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2008. Eviran julkaisu, 14/2010, Helsinki 2010.
- Nylen G, Dunstan F, Palmer S R, Andersson Y, Bager F, Cowden J, Feierl G, Galloway Y, Kapperud G, Megraud F, Molbak K, Petersen L R & Ruutu P (2002). The seasonal distribution of *Campylobacter* infection in nine European countries and New Zealand. *Epidemiology & Infection*, 128: 383–390.
- Oliver S P, Jayarao B M & Almeida R A (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and the public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2: 115–129.
- Olson C K, Ethelberg S, van Pelt W & Tauxe R V (2008). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations. Teoksessa: Nachamkin I, Szymanski C M & Blaser M (toim.). *Campylobacter*. ASM Press, Washington DC, USA, s. 163–189.
- On S L W (2013). Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*. Where to from here? *Journal of Microbiological Methods*, 95: 3–7.
- Orr K E, Lightfoot N F, Sisson P R, Harkis B A, Tweddle J L, Boyd P, Carrol A, Jackson C J, Wareing D R A & Freeman R (1995). Direct excretion of *Campylobacter jejuni* in a dairy cow causing cases of human enteritis. *Epidemiology & Infection*, 114: 15–24.

- Pantoja J C F, Reinemann D J & Ruegg P L (2009). Associations among milk quality indicators in raw bulk milk. *Journal of Dairy Science*, 92: 4978–4987.
- Park S F (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 177–188.
- Parkhill J, Wren B W, Mungall K, Ketley J M, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies R M, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev A V, Moule S, Pallen M J, Penn C W, Quail M A, Rajandream M-A, Rutherford K M, van Vliet A H M, Whitehead S & Barrell B G (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403: 665–668.
- Perkiömäki J, Leimi A & Tuominen P (2012). Suomessa tuotetun raakamaidon biologiset vaarat. *Eviran julkaisuja*, 4/2012, Helsinki.
- Peterson M C (2003). *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. *Journal of Environmental Health*, 65: 20–21.
- Phadtare S, Alsina J & Inouye M (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 175–180.
- Pihlajasaari A, Nakari U-M & Miettinen I (2012). Ruokamyrkytykset Suomessa vuonna 2010. *Eviran julkaisuja*, 10/2012, Helsinki 2012.
- Pittenger L G, Englen M D, Craig T P, Frye J G, Quiñones B, Horn S T, Son I, Fedorka-Cray P J & Harrison M A (2009). Genotyping *Campylobacter jejuni* by Comparative Genome Indexing: An Evaluation with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and *flaA* SVR Sequencing. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6: 337–349.
- Poirel L, Bercot B, Millemann Y, Bonnin R A, Pannaux G & Nordmann P (2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France. *Emerging Infectious Diseases*, 18: 523–525. LETTERS
- Potter R C, Kaneene J B & Hall W M (2003). Risk factors for sporadic *Campylobacter jejuni* infections in rural Michigan: A Prospective Case-Control Study. *American Journal of Public Health*, 93: 2118–2123.
- Rapp D, Ross C M, Pleydell E J & Muirhead R W (2012). Differences in the fecal concentrations and genetic diversities of *Campylobacter jejuni* populations among individual cows in two dairy herds. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 7564–7571.
- Rasmussen M D, Bjerring M, Justesen P & Jepsen L (2002). Milk quality on Danish farms with automatic milking systems. *Journal of Dairy Science*, 85: 2869–2878.
- Reuter M, Mallet A, Pearson B A & van Vliet A H M (2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2122–2128.
- Ribot E M, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B & Barrett T J (2001). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 1889–1894.
- Riordan T, Humphrey T J & Fowles A (1993). A point source outbreak of *campylobacter* infection related to bird-pecked milk. *Epidemiology and Infection*, 110: 261–265.
- Robinson D A (1981). Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*, 282:1584.

- Ronacher K A, Lee A, Wan J, Roginski H, Michalski W P & Coventry M J (2003). Antimicrobial action of the lactoperoxidase system on *Campylobacter* species. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58: 205.
- Rosef O, Rettedal G & Lågeide L (2001). Thermophilic campylobacters in surface water: a potential risk of campylobacteriosis. *International Journal of Environmental Health Research*, 11: 321–327.
- Ruusunen M, Salonen M, Pulkkinen H, Huuskonen M, Hellström S, Revez J, Hänninen M-L, Fredriksson-Ahomaa M & Lindström M (2013). Pathogenic bacteria in Finnish bulk tank milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10: 99–106.
- Rysanek D & Babak V (2005). Bulk tank somatic cell count as an indicator of the hygiene status of primary milk production. *Journal of Dairy Research*, 72: 400–405.
- Sails A D, Swaminathan B & Fields P I (2003). Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4733–4739.
- Salama S M, Tabor H, Richter M & Taylor D E (1992). Pulsed-field gel electrophoresis for epidemiologic studies of *Campylobacter hyointestinalis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 1982–1984.
- Salovuori H, Ronkainen P & Heino A (2005). Introduction of automatic milking system in Finland: effect on milk quality. *Agricultural and Food Science*, 14: 346–353.
- Schildt M, Savolainen S & Hänninen M-L (2006). Long-lasting *Campylobacter jejuni* contamination in milk associated with gastrointestinal illness of farming family. *Epidemiology & Infection*, 134: 401–405.
- Schönberg-Norio D, Takkinen J, Hänninen M-L, Katila M-L, Kaukoranta S-S, Mattila L & Rautelin H (2004). Swimming and *Campylobacter* infections. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 1474–1477.
- Serraino A, Florio D, Giacometti F, Piva S, Mion D & Zanoni R G (2013). Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of a water buffalo dairy farm in Italy. *Journal of Dairy Science*, 96: 2801–2807.
- Sharma N, Singh N K & Bhadwal M S (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 24: 429–438.
- Simões M, Simões L C, Machado I, Pereira M O & Vieira M J (2006). Control of flow-generated biofilms with surfactants: Evidence of resistance and recovery. *Food and Bioprocess Technology*, 84: 338–345.
- Simões M, Simoes L C & Vieira M J (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT – Food Science and Technology*, 43: 573–583.
- Smigig N, Djekic I, Tomasevic I, Miocinovic J & Gvozdenovic R (2012). Implication of food safety measures on microbial quality of raw and pasteurized milk. *Food Control*, 25: 728–731.
- Solow B T (2003). Effect of temperature on viability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on raw chicken or pork skin. *Journal of Food Protection*, 66: 2023–2031.

- Sproston E L, Ogden I D, MacRae M, Forbes K J, Dallas J F, Sheppard S K, Cody A, Colles F, Wilson M J & Strachan N J C (2010). Multi-locus sequence types of *Campylobacter* carried by flies and slugs acquired from local ruminant faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 829–838.
- Stanley K & Jones K (2003). Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 104S–113S.
- Strachan N J C, Gormley F J, Rotariu O, Ogden I D, Miller G, Dunn G M, Sheppard S K, Dallas J F, Reid T M, Howie H, Maiden M C J & Forbes K J (2009). Attribution of *Campylobacter* infections in Northeast Scotland to specific sources by use of multilocus sequence typing. *Journal of Infective Diseases*, 199: 1205–1210.
- Tartuntatautirekisteri (2013). Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Viitattu 14.3.2014. Saatavissa: <http://www3.thl.fi/stat/>.
- Tartuntatautirekisteri (2014). Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Viitattu 14.3.2014. Saatavissa: <http://www3.thl.fi/stat/>.
- Taylor E V, Herman K M, Ailes E C, Fitzgerald C, Yoder J S, Mahon B E & Tauxe R V (2013). Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997–2008. *Epidemiology & Infection*, 141: 987–996.
- Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, Mickelsen P A, Murray B E, Persing D H & Swaminathan B (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2233–2239.
- Teunis P, Van den Brandhof W, Nauta M, Wagenaar J, Van den Kerkhof H & Van Pelt W (2005). A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiology & Infection*, 133: 583–592.
- Tike, Maa- ja metsätalousministeriön tietopalvelukeskus (2014). Ravintotase 2012, ennakkotiedot. Saatavissa: http://www.maataloustilastot.fi/ravintotase-2012-ennakko-ja-2011-lopulliset-tiedot_fi. Viitattu 22.2.2014.
- Trachoo N, Frank J F & Stern N J (2002). Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. *Journal of Food Protection*, 65: 1110–1116.
- Trachoo N & Frank J F (2002). Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni*-containing biofilms. *Journal of Food Protection*, 65: 1117–1121.
- Tribble D R, Baqar S, Scott D A, Oplinger M L, Trespalacios F, Rollins D, Walker R I, Clements J D, Walz S, Gibbs P, Burg E F III, Moran A P, Applebee L & Bourgeois A L (2010). Assessment of the duration of protection in *Campylobacter jejuni* experimental infection in humans. *Infection and Immunology* 78: 1750–1759.
- Vacheyrou M, Normand A-C, Guyot P, Cassagne C, Piarroux R & Bouton Y (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology*, 146: 253–262..
- Valtioneuvoston asetus 1258/2011. Valtioneuvoston asetus eräistä elintarviketurvallisuusriskeiltään vähäisistä toiminnoista. Viitattu 15.3.2014. Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2011/20111258>.
- Verdier-Metz I, Michel V, Delbes C & Montel M-C (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology*, 26: 305–310.

- Verdier-Metz I, Gagne G, Bornes S, Monsallier F, Veisseire P, Delbés-Paus C & Montel M-C (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 326–333.
- Verhoeff-Bakkenes L, Hazeleger W C, de Jonge R & Zwietering M H (2009). *Campylobacter jejuni*: a study on environmental conditions affecting culturability and in vitro adhesion/invasion. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 924–931.
- van Vliet A H & Ketley J M (2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90:45–56.
- Walstra P, Wouters J T M & Geurts J T (2005). *Microbiology of Milk*. Teoksessa: Dairy Science and Technology, 2nd Edition. CRC Press, 2005.
- Wassenaar T M, Geilhausen B & Newell D G (1998). Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1816–1821.
- Wassenaar T M & Newell D G (2001). Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1–9.
- Waterman S C, Park R W & Bramley A J (1984). A search for the source of *Campylobacter jejuni* in milk. *Journal of Hygiene*, 93: 333–337.
- Wesley I V, Wells S J, Harmon K M, Green A, Schroeder-Tucker L, Glover M & Siddique I (2000). Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1994–2000.
- Whyte P, McGill K, Cowley D, Madden R H, Moran L, Scates P, Carrol C, O’Leary A, Fanning S, Collins J D, McNamara E, Moore J E & Cormican M (2004). Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 111–118.
- Wysok B, Wiszniewska-Łaszczych A, Uradziński J & Sztejn J (2011). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in raw milk in the selected areas in Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14: 473–477.
- Zhao C, Ge B, De Villena J, Sudler R, Yeh E, Zhao S, White D G, Wagner D & Meng J (2001). Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork and beef from the Greater Washington, D. C., Area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5431–5436